Aus den Immunologischen Laboratorien
Leitung: Prof. Dr. K. O. Vorlaender
apl. Professor am Klinikum Charlottenburg
der Freien Universität Berlin

Die Methoden zur Messung der hämolytischen Komplementgesamtaktivität im kritischen Vergleich

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mathias Wagner
aus Berlin

1985

Aus den Immunologischen Laboratorien
Leitung: Prof. Dr. K. O. Vorlaender
apl. Professor am Klinikum Charlottenburg
der Freien Universität Berlin

Die Methoden zur Messung der hämolytischen Komplementgesamtaktivität im kritischen Vergleich

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mathias Wagner
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. K. O. Vorlaender

Korreferent: Prof. Dr. U. Hopf

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 28. Oktober 1985

Druck: Zentrale Universitäts-Druckerei der Freien Universität Berlin

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Fragestellung der Arbeit	5
1.1. Vorbemerkung	5
1.2. Aktivierungswege und Kontrollmechanismen	5
1.3. Biologische Bedeutung	6
1.4. Grundzüge pathologischer Komplementaktivierung	6
1.5. Methoden der Komplementbestimmung	9
1.6. Komplementveränderungen bei menschlichen Erkrankungen	10
1.7. Zusammenfassung und Fragestellung	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Vorbemerkungen	13
2.2. CH50-Methodik	13
2.2.1. Methodische Voraussetzungen	13
2.2.2. Material	15
2.2.2.1. Geräte	15
2.2.2.2. Reagenzien	15
2.2.2.3. Puffer- und Vorratslösungen	16
2.2.3. Voruntersuchungen zur Methodik	16
2.2.3.1. Beziehung zwischen Extinktion und Hämoglobinkonzentration	16
2.2.3.2. Bestimmung der optimalen Ambozeptorverdünnung	18
2.2.4. Versuchsdurchführung	20
2.2.4.1. Herstellung der isotonischen Arbeitspuffer (nach Rapp u. Borsos)	20
2.2.4.2. Behandlung der Hammelerythrozyten	21
2.2.4.3. Behandlung des Serums	22
2.2.4.4. Herstellung der Ansätze	23
2.2.5. Auswertung der Versuchsergebnisse	25
2.3. CH100-Methodik	29
2.3.1. Vorbemerkungen	29
2.3.2. Material	29
2.3.3. Behandlung der Seren, Durchführung der Immundiffusion	29
2.3.4. Auswertung der Versuchsergebnisse	30
2.4. Zusammenfassung der methodischen Voraussetzungen	31
3. Ergebnisse der vergleichenden Messung	32
3.1. Erläuterung zu den Abschnitten 3.2. bis 3.4.	32
3.2. Ergebnisse der vergleichenden Messung im physiologischen Bereich	33

3.3. Ergebnisse der vergleichenden Messung im pathologische Bereich 35
3.3.1. Erhöhte CH100-Titer 35
3.3.2. Erniedrigte CH100-Titer 35
3.4. Graphische Darstellung der Ergebnisse 37
4. Bewertung der Meßergebnisse in einer kritischen Besprechung 38
4.1. Ausgangssituation 38
4.2. Regressionsanalyse mittels Computerprogramms 38
4.3. Diskussion 45
4.4. Schlußfolgerungen für die Klinik 46
5. Klinische Einzelbeispiele 47
6. Zusammenfassung 53
Literaturverzeichnis 55

1. Einleitung und Fragestellung der Arbeit

1.1. Vorbemerkung

Das Komplementsystem ist als wichtiger humoraler Mediator von Antigen-Antikörper-Reaktionen Bestandteil der biologischen Abwehr wie auch der Pathogenese bestimmter Erkrankungen. Seine Funktionen sind vorwiegend membranorientiert. Die 21 Komplementproteine haben die höchste Umsatzrate aller Plasmaeiweiße, wobei die Hauptorte ihrer Synthese das mononukleär-phagozytierende System und die Leber sind (Opferkuch u. Cullmann). Eine enge funktionelle Wechselbeziehung besteht zwischen Komplementsystem und Blutgerinnungs-, fibrinolytischem und Kininsystem.

1.2. Aktivierungswege und Kontrollmechanismen

Die Aktivierung des Komplementsystems durch IgG1-3 oder IgM enthaltende Immunkomplexe oder durch Antikörper-Aggregate dieser Immunglobulinklassen leitet den sogenannten klassischen Weg ein. Neun Komponenten werden kaskadenförmig aktiviert, die Komponenten 1-5 enzymatisch, die Komponenten 6-9 durch Komplexbildung. Die Bindung der ersten Komplementkomponente erfordert ein IgM-Molekül oder zwei dichtstehende IgG-Moleküle.

Der alternative Aktivierungsweg (Properdinsystem, Nebenschluß) ermöglicht dem Organismus humorale Erregerabwehr auch ohne Vermittlung spezifischer Antikörper und somit ohne Latenzzeit. Unter Umgehung der ersten drei Komponenten des klassischen Weges wird direkt die Komponente C3 aktiviert, der eine zentrale biologische Bedeutung zukommt. Wichtige Aktivatoren des alternativen Weges sind komplexe Kohlenhydrate wie Inulin, Dextran und Zymosan sowie Lipopolysaccharide wie bakterielles Endotoxin. Auch Antikörper-Aggregate einschließlich der ansonsten nicht komplementbindenden Antikörperklassen (Jäger), physikochemische Faktoren und der klassische Weg selbst können zur Nebenschlußaktivierung führen. Der alternative Weg unterliegt einer positiven Rückkoppelung.

Eine Komplementaktivierung durch direkte enzymatische Spaltung von Einzelfaktoren durch Proteasen anderer Plasmaproteinsysteme, Proteasen bakteriellen Ursprungs oder traumatisch freigesetzte Gewebsproteasen ist ebenfalls möglich (Hadding).

Die Kontrolle des sich durch Amplifikationsmechanismen selbst verstär-

kenden Komplementablaufs ist gewährleistet durch den spontanen Zerfall labiler, im Rahmen der Aktivierung entstehender Enzyme und durch Inhibitoren bestimmter Komplementkomponenten.

1.3. Biologische Bedeutung

Die biologischen Konsequenzen der Komplementaktivierung erweisen sich in zwei ineinandergreifenden Funktionsbereichen:

Spaltprodukte einzelner Komplementkomponenten werden in die flüssige Phase freigesetzt und bewirken neben einer direkten vaskulären Permeabilitätssteigerung und einer Histaminfreisetzung eine Chemotaxis von Granulozyten und Makrophagen sowie eine Freisetzung lysosomaler Enzyme. Durch diese Wirkungen wird eine Entzündungsreaktion mit Störung der Mikrozirkulation hervorgerufen, die ihrerseits zusammen mit komplementunabhängigen Entzündungsmediatoren das Milieu schafft für die Ausschaltung der Zellen durch Membranangriff. Hierbei steht die Zytolyse durch Membranschädigung am Ende der Komplementkaskade, wie es bei der Auflösung sensibilisierter Hammelerythrozyten und bei der Bakterizidie und ähnlichen Vorgängen der Fall ist.

Von größerer klinischer Bedeutung als die Zytolyse sind Immunadhärenz und Opsonierung (Brade). Letztere bewirkt eine Phagozytosesteigerung über eine Veränderung von Zelloberflächen durch aktivierte komplexgebundene Komponenten. Dieser Mechanismus beteiligt Komplement unter anderem an der Beseitigung von Immunkomplexen.

Die Virusneutralisation ist eine Funktion der frühen Komponenten. Nach neueren Erkenntnissen spielt Komplement auch in der Induktionsphase der Immunreaktion eine Rolle (Opferkuch u. Cullmann).

1.4. Grundzüge pathologischer Komplementaktivierung

Die allergischen Reaktionen vom Typ II (zytotoxische Reaktion, s.u.) und Typ III (Immunkomplexreaktion, s.u.) der Einteilung nach Gell und Coombs (1975) gehen mit einer Aktivierung von Komplement einher. Für die anaphylaktische Reaktion durch zytotrope Antikörper und die zellgebundene Allergie ist sie ohne Belang.

Die Immunreaktion Typ II erfolgt durch Antikörper, die sich gegen primäre oder sekundäre Bestandteile von Zelloberflächen richten. Dies ist bei verschiedenen menschlichen Erkrankungen der Fall, etwa beim Good-

pasture-Syndrom und den autoimmunhämolytischen Anämien. Das Komplementsystem ist häufig einbezogen, dies ist jedoch nicht obligat: Bei der durch gegen die glomeruläre Basalmembran gerichtete Antikörper hervorgerufenen Nephritis (Goodpasture-Syndrom) zeigen 75 % der Fälle eine Komplementbeteiligung, nachgewiesen durch Immunfluoreszenz (McLean u. Michael 1974).

Dem Reaktionstyp III kommt die größere pathogenetische Bedeutung zu (Müller-Eberhard 1976). Die Immunreaktion findet hierbei in der Zirkulation oder im Gewebe statt. Die entstandenen Immunkomplexe werden dann pathogenetisch bedeutsam, wenn unter bestimmten Bedingungen - wie es bei einer kontinuierlichen Überbelastung mit Immunkomplexen angenommen wird (Krech) - diese normalerweise phagozytierten Komplexe ihrer Elimination entgehen und an Gewebsstrukturen außerhalb des phagozytären Systems vornehmlich entlang der Wandungen kleinerer Gefäße sowie der glomerulären Basalmembranen abgelagert werden. Für die Gewebsfixierung maßgebend sind Zusammensetzung und Größe der Komplexe: Sehr kleine Immunkomplexe am Anfang der Komplexbildung zirkulieren lange ohne Ablagerung und Gewebsreaktion, sehr große werden schnell durch das makrozytär-phagozytierende System abgefangen. Am wirkungsvollsten sind etwas größere Komplexe (mindestens 19 S) im Bereich mäßigen Antigenüberschusses.

Für chronische Erkrankungen, bei denen die Bildung löslicher Immunkomplexe eine pathogenetische Rolle spielt, gelten nach Steffen die Voraussetzungen einer längeren Antigenzufuhr und einer sehr schwachen Antikörperbildung (Jäger). Persistierende Infektionen mit ständiger Neubildung von Antigen in Kombination mit einer schwachen Immunreaktion gewährleisten einen längeren Antigenüberschuß und erhöhen damit das Risiko einer Immunkomplexerkrankung. Schwache Antigene (wie DNS) können die Relation zwischen Antigen und Antikörper ebenfalls nachteilig beeinflussen.

Die Ablagerung von Immunkomplexen wird auch durch den Zustand der Gefäßwand bestimmt: Die Permeabilitätssteigerung durch vasoaktive Mediatoren, vor allem Histamin erhöht die Immunkomplexablagerung beträchtlich. Die intravaskuläre Freisetzung dieser Substanzen aus basophilen Granulozyten bzw. Thrombozyten erfolgt komplementabhängig durch Immunadhärenz und Anaphylatoxinwirkung und komplementunabhängig hauptsäch-

lich durch den 1972 von Cochrane und Koffler bei Kaninchen beschriebenen Basophilenmechanismus, der auch in der Humanpathologie eine große Bedeutung hat (Tilz). Die Lokalisation der Ablagerungen betrifft die Stellen physiologischer Plasmadiffusion oder -filtration, die größeren Immunkomplexe werden in den Basalmembranen festgehalten. Prädilektionsstellen ergeben sich durch die hämodynamischen Verhältnisse.

Die gewebefixierten Komplexe reagieren mit humoralen und zellulären Faktoren des Organismus und führen zu Gewebsläsionen ähnlich denen anderer Immunreaktionsformen, z.B. der Typ II-Reaktion. Diese der Komplexdeposition entlang der Elastica interna von Gefäßen und der Basalmembran der Glomerula folgenden Vorgänge sind in erster Linie durch die Komplementaktivierung und die Granulozytenansammlung bedingt. Bei der Serumkrankheit kommt es zum Zeitpunkt der Antigen-Antikörper-Reaktion 10-12 Tage nach Antigenexposition zu einem signifikanten Abfall der Komplementaktivität. Kurz darauf erreichen die Gewebsläsionen ihr Maximum.

Die Bedeutung von Komplementaktivierung und Granulozyteninfiltration ergibt sich folgendermaßen: Im Verlauf der Immunreaktion mit anschließender Komplementbindung kommt es zur C3-Spaltung, C3b wird an die Komplexe gebunden. Die Bruchstücke C3a und das in der Folge entstehende C5a setzen Histamin aus Mastzellen frei. Die von C5a und dem C5b67-Komplex angelockten Leukozyten häufen sich am Ort der Antigen-Antikörper-Komplement-Komplexe an und setzen ihre lysosomalen Enzyme frei. Als Ergebnis vaskulärer Permeabilitätssteigerung durch die Anaphylatoxine und lysosomaler Enzymwirkung resultiert der Gewebsschaden. Das Gerinnungssystem ist beteiligt vor allem durch komplementabhängige Thrombozytenaggregation mit Freisetzung von Plättchenfaktor 3 und durch die Gefäßwandschädigung; es kommt zu Kapillarverschlüssen durch intravasale Gerinnung (nach Müller-Eberhard). Die Bedeutung der Granulozyteninfiltrate ist unterschiedlich: Für die Arthusreaktion sind sie Voraussetzung, wohingegen sich die chronische Glomerulonephritis weitgehend ohne Granulozyteninfiltrate entwickelt.

Bei folgenden menschlichen Erkrankungen gibt es Hinweise auf zirkulierende Immunkomplexe oder lokal abgelagerte Immunpräzipitate: Lupus erythematodes, Glomerulonephritis, Immunvaskulitis, rheumatoide Ar-

thritis, M.Sjögren, idiopathische Lungenfibrose, Serumkrankheit und verwandte Arzneimittelreaktionen, subakute bakterielle Endokarditis, Virusinfektionen, Malaria, Lepra, chronische Lebererkrankungen sowie einige Gammopathien (Müller-Eberhard 1976). Hierbei handelt es sich um chronische Erkrankungen, zu deren Erklärung das Modell der Serumkrankheit herangezogen wird. Die Art der Schädigung ähnelt häufig experimentellen komplexinduzierten Läsionen.

1.5. Methoden der Komplementbestimmung

Die Komplementbeteiligung bei menschlichen Erkrankungen kann direkt aufgezeigt werden durch den immunhistologischen Nachweis der Ablagerung von Komplementkomponenten im Gewebe (meist zusammen mit Immunglobulinen), z.B. in der Niere oder der Haut. Indirekt ergeben Komplementbestimmungen in verschiedenen Körperflüssigkeiten Aufschluß über die Bedeutung von Komplement für den Krankheitsverlauf. Metabolismusuntersuchungen einzelner Komponenten sind sehr aufwendig und finden selten Anwendung.

Bestimmungen des Komplementgehalts in Körperflüssigkeiten (Serum, Synovialflüssigkeit, Liquor) beinhalten funktionelle und immunchemische Testverfahren mit einem methodischen Fehler zwischen 7 und 15 % (Opferkuch u. Cullmann).

Die funktionellen Tests haben den höheren Aussagewert, sind aber meist Speziallabors vorbehalten. Die einfacher durchzuführenden proteinchemischen Methoden dagegen sind auch im Routinelabor anwendbar.

Ein gebräuchliches immunchemisches Verfahren ist die radiale Immundiffusion nach Mancini, die unkompliziert und gut reproduzierbar die Bestimmung von Einzelkomponenten und Inhibitoren ermöglicht. Nachteilig ist, daß bei dieser Methode der Aktivitätszustand des Moleküls nicht beurteilt werden kann. Außerdem sind die geringe Genauigkeit bei Spurenproteinen und die Möglichkeit fälschlich erhöhter Messungen vor allem durch die lange Inkubationszeit anzumerken.

Als funktioneller Test ist die Bestimmung der hämolytischen Komplementgesamtaktivität eine gute und gebräuchliche Übersichtsmethode, jedoch bleiben Verminderungen der Konzentration einzelner Komponenten bis auf 50 % der Norm und darunter sowie Abweichungen der meisten Faktoren des alternativen Weges weitgehend ohne Einfluß auf das Meßergeb-

nis (Alper u. Rosen, Gewurz u. Suyehira). Die Methode beruht auf der Auflösung spezifisch sensibilisierter Hammelerythrozyten durch den Komplementgehalt des getesteten Serums und - im Fall der CH50-Bestimmung - der anschließenden photometrischen Messung des freigesetzten Hämoglobins. Die graphische Darstellung erfolgt durch Auftragung der Komplementkonzentration gegen den Hämolysegrad und ergibt eine Sigmakurve, deren größte Anstiegssteilheit im Bereich der 50%igen Lyse liegt. Die Bestimmung der für eine Auflösung von 50% der eingesetzten Erythrozyten erforderlichen Komplementmenge - ausgedrückt in CH50-Einheiten - erlaubt die quantitative Abschätzung der Komplementaktivität. Diese Methode wurde 1961 von Mayer eingeführt (Kabat u. Mayer).

Wesentlich einfacher in der Durchführung und damit geeignet für Routinezwecke, jedoch mit einer größeren Fehlerbreite verbunden (Opferkuch u. Cullmann) ist die Bestimmung des Endpunktes der hämolytischen Aktivität mit Hilfe standardisierter Platten, wobei die ringförmige Lyse sensibilisierter Hammelerythrozyten im Agar durch Diffusion von Serum Grundlage der in CH100-Einheiten ausgedrückten Messung ist. Gebrauchsfertige Diffusionsplatten sind kommerziell erhältlich und werden von den Kallestad Laboratorien (USA) seit 1970 hergestellt.

1.6. Komplementveränderungen bei menschlichen Erkrankungen

Die häufigste Veränderung des hämolytischen Komplements im Serum ist eine Erhöhung im Rahmen der akuten Phase-Reaktion bei entzündlichen Erkrankungen; verschiedene Einzelkomponenten sind hierbei ebenfalls vermehrt. Ein erhöhtes Serumkomplement bei Glomerulonephritiden ist in einer neueren Untersuchung als schlechtes prognostisches Zeichen bestätigt worden (Rashid et al.).

Eine hochgradige Erniedrigung des Komplementspiegels kann durch Synthesedefekte einzelner Komponenten oder Inhibitoren bedingt sein. Diese sind angeboren oder erworben, letzteres etwa bei chronischen Lebererkrankungen oder als vorübergehende Erscheinung in Verbindung mit komplementkonsumierenden Prozessen.

Genetisch fixierte Defekte sind selten. Der häufigste betrifft den C1-Inaktivator, die hierdurch beeinträchtigte Regulation der Komplementaktivierung führt zum klinischen Bild des nichtallergischen hereditären angioneurotischen Ödems. Von einem C3b-Inaktivatormangel be-

troffene Patienten neigen ebenso wie C3-defiziente Personen zu schweren rezidivierenden Infektionen mit pyogenen Keimen. Bei Defekten der anderen Komponenten ist eine leichtere Störung der Infektabwehr möglich, und es besteht eine Prädisposition für Immunkomplex-Krankheiten.

Eine Komplementverminderung durch Verbrauch ist zurückzuführen auf eine überschießende Aktivierung im Rahmen pathologischer Immunreaktionen, insbesondere Immunkomplexerkrankungen. Der Nachweis zirkulierender Immunkomplexe ist häufig gekoppelt mit Störungen des Komplementlevels (Gewurz u. Suyehira). Ein vermindertes hämolytisches Serumkomplement findet sich demzufolge bei Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes, der akuten Glomerulonephritis, der membranoproliferativen Glomerulonephritis und der akuten Serumkrankheit. Vornehmlich Krankheiten mit Nierenbeteiligung resultieren aufgrund der großen vaskulären Oberfläche der Niere und des damit verbundenen großen Komplementverbrauchs in einer entsprechenden Veränderung des Serumkomplements (Rother et al.).

Je nach vorherrschendem Aktivierungsmodus wird sich neben der Verminderung der Gesamtaktivität eine Erniedrigung der frühen Komponenten einschließlich C3 (klassischer Weg) oder eine selektive C3-Erniedrigung (alternativer Weg) ergeben.

Ein niedriges Gesamtkomplement bei systemischem Lupus erythematodes weist auf einen besonders aktiven Prozeß hin (Schur u. Sandson). Es ist eine rasche Progredienz, insbesondere eine Nierenbeteiligung zu erwarten. Der CH50-Test korreliert besser mit der Erkrankungsaktivität als die Bestimmung der Antikörper gegen native DNS durch Antigenbindung und Komplementfixation (Miniter et al.). Die Erniedrigung der Komponente C4 geht der C3-Verminderung meist voran und ist zudem stärker ausgeprägt und länger persistierend.

Im Verlauf einer akuten Poststreptokokken-Glomerulonephritis kommt es in der Regel zu einem Absinken der hämolytischen Komplementaktivität im Serum. Mit Rückgang der Nephritis normalisiert sich der Wert. Parallel hierzu verläuft die Normalisierung von C3 und C5, während die anderen anfangs ebenfalls erniedrigten klassischen Komponenten schon nach wenigen Tagen wieder ihre Normalwerte erreichen.

Bei der chronisch verlaufenden membranoproliferativen Glomerulonephri-

tis (chronisch hypokomplementämische Glomerulonephritis) ist die Aktivierung des alternativen Weges von großer Bedeutung. Häufig ist der sogenannte Nephritis-Faktor im Serum nachweisbar, dessen Auftreten als ein Merkmal dieser Erkrankung anzusehen ist, ohne mit der Klinik der Nephritis zu korrelieren (Stanziale et al.).

Die rheumatoide Arthritis geht mit einer starken lokalen Komplementaktivierung bei normalem oder erhöhtem Serumkomplement einher. In der Synovialflüssigkeit hingegen sind die ersten Komponenten sowie das Gesamtkomplement deutlich vermindert.

Eine Auflistung der mit Komplementverbrauch verbundenen Krankheiten ist bei Opferkuch u. Cullmann gegeben. Anzumerken ist, daß auch bei erhöhtem Umsatz ein normaler Komplementtiter durch kompensatorisch gesteigerte Synthese von Komplementfaktoren vorliegen kann. Dies ist Ausdruck des dynamischen Gleichgewichtes zwischen Synthese und Katabolismus (Alper u. Rosen).

1.7. Zusammenfassung und Fragestellung

Die Erniedrigung der Komplementaktivität weist auf das Vorhandensein eines aktiven immunologischen Prozesses hin. Die Bestimmung ermöglicht gemeinsam mit anderen Parametern die Beurteilung des Ausmaßes entzündlicher Aktivität sowie eine Prognose der möglichen Konsequenzen eines Immunprozesses und dient der therapeutischen Verlaufskontrolle.

Die im Routinelabor am häufigsten proteinchemisch bestimmten Komponenten sind C3 und C4. C3 ist die biologisch wichtigste Komponente als Bestandteil beider Aktivierungswege, C4 gibt Auskunft über den klassischen Weg. Die Anwendung beider Bestimmungen gemeinsam gibt einen Anhaltspunkt, ob eine Aktivierung von Komplement vorliegt. Da jedoch ein erniedrigter CH50-Level mit normalen C3- und C4-Werten einhergehen kann (Salkie u. Kelker), ist eine zusätzliche Bestimmung der hämolytischen Gesamtaktivität notwendig.

Hierfür stehen, wie oben bereits ausgeführt, zwei Methoden zur Verfügung. Die CH50-Methodik gilt als wesentlich genauer gegenüber der CH100-Bestimmung. Letztere zeichnet sich jedoch durch einen erheblichen Zeit- und Kostenvorteil aus, denn sie ist die einzige Methode, die ebenso einfach durchzuführen ist wie die radiale Immundiffusion und gleichzeitig eine Abschätzung der Komplementaktivität auf funktio-

neller Basis erlaubt.

Ein Vergleich zwischen den Resultaten beider Methoden liegt bislang nicht vor. Die vorliegende Arbeit hat die Aufgabe, beide Methoden zur Bestimmung der hämolytischen Komplementgesamtaktivität einander gegenüber zu stellen.

2. Material und Methoden

2.1. Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit beruht auf der Bestimmung der hämolytischen Komplementgesamtaktivität von 122 Patientenseren. Grundlage hierfür waren die CH50-Methodik nach Mayer (Kabat u. Mayer) in der Mikrolitersystem-Modifikation (Ringelmann et al.) und die CH100-Bestimmung durch radiale Immundiffusion auf standardisierten Diffusionsplatten (Quantiplate-K, Biotest). Diejenigen Seren, die nach Zentrifugation der im Labor entnommenen bzw. eintreffenden Blutproben nicht sofort untersucht werden konnten, wurden bei -20°C eingefroren und dort bis zu einer Woche aufbewahrt (Aktivitätsverlust durch Erwärmung).

2.2. CH50-Methodik

2.2.1. Methodische Voraussetzungen

Die Bestimmung der CH50-Einheiten basiert auf der photometrischen Messung von Hämoglobin, das durch die komplementvermittelte Auflösung spezifisch sensibilisierter Hammelerythrozyten unter standardisierten Versuchsbedingungen freigesetzt worden ist. Die graphische Auftragung der eingesetzten Komplementkonzentration gegen den ermittelten Hämolysegrad ergibt eine Sigmakurve (Abb.1).

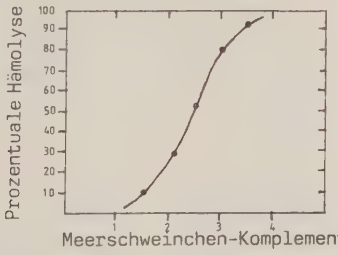


Abb.1 Prozentsatz der Hämolyse optimal sensibilisierter Hammelerythrozyten als Funktion des Volumens einer Meerschweinchen-Komplementverdünnung (60 Min. Inkubation bei 37°C), aus: Kabat u. Mayer

Diejenige Komplementmenge, die eine komplette Hämolyse (100%) hervorruft, ist hier experimentell nicht sehr genau zu bestimmen. Im Bereich der 50%igen Lyse hingegen ist die Kurve steil, und die Empfindlichkeit der hämolytischen Antwort auf Änderungen der Komplementkonzentration ermöglicht eine exakte Bestimmung des Komplementtiters.

Die für die Auflösung der Hälfte der eingesetzten Erythrozyten erforderliche Komplementmenge wird als eine CH50-Einheit bezeichnet. Mathematisch wird die Beziehung zwischen Hämolysegrad und Komplementkonzentration ausgedrückt durch die von Krogh'sche Gleichung:

$$x = K \left(\frac{y}{1-y}\right)^{1/n}$$

Erläuterung: x = Komplementkonzentration (ausgedrückt in ml Serumverdünnung)

y = Hämolysegrad (in $\frac{\%\text{Hämolyse}}{100}$)

1/n = üblicherweise 0,2±10%, ist jedoch von den experimentellen Bedingungen abhängig

(Konstante) K = 1 CH50-Einheit: an diesem Punkt ist y = 0,5 (50%-Hämolyse), also gilt x = K

Die logarithmische Umformung der von Krogh'schen Gleichung ergibt:

$$\log x = \log K + \frac{1}{n} \log \left(\frac{y}{1-y}\right)$$

Die Bedeutung dieser Beziehung für die Auswertung der Versuchsergebnisse wird unter 2.2.5. beschrieben.

Die hämolytische Aktivität von Komplement und damit der ermittelte Komplementtiter ist von folgenden Faktoren abhängig:

- Konzentration (und Fragilität) der Erythrozyten
- Art und Menge des zur Sensibilisierung verwendeten Antikörpers
- Ionenstärke des Reaktionssystems
- Konzentration von Mg^{++} und Ca^{++}
- pH-Wert
- Reaktionszeit
- Reaktionsvolumen
- Temperatur

Mayer definiert die hämolytische Komplementeinheit (CH50) als diejenige in Milliliter ausgedrückte Menge, die $2,5 \times 10^8$ optimal sensi-

bilisierte rote Blutkörperchen (von insgesamt 5 x 10^8 Zellen) bei optimaler Ca^{++}- und Mg^{++}-Konzentration sowie einer Ionenstärke von 0,147 nach einstündiger Inkubation bei 37°C in einem Gesamtreaktionsvolumen von 7,5 ml hämolysieren.

Eine Reduktion dieses Volumens auf 1,5 ml durch Verminderung aller Bestandteile des Ansatzes auf ein Fünftel unter Verwendung des Mikrolitersystems der Fa.Eppendorf ergab eine gute Übereinstimmung von Makro- und Mikroansatz sowohl hinsichtlich der graphisch ermittelten Komplementtiter als auch hinsichtlich der bestimmten Einzel-Hämolyse-Werte (Ringelmann et. al.).

2.2.2. Material

2.2.2.1. Geräte

- Einweg-Kunststoff-Reaktionsgefäße 1,5 ml Volumen
- Eppendorf-Pipetten (100µl, 200µl, 1000µl)
- Rotationsmischer (Eppendorf)
- Eppendorf-Spezialzentrifuge
- Lauda-Ultra-Thermostat (WB 20) mit Universal-Relaisbox R10-Electronic sowie Kontrollthermometer Regelgenauigkeit ± 0,01...0,02°C
- Photometer, Wellenlänge 546 nm
- Halbmikroküvetten, 1cm Schichtdicke
- pH-Meter
- Feinwaage
- Zentrifuge
- Zentrifugengläser 30ml, Reagenzgläser
- Meßkolben (100ml, 500ml, 1000ml, 2000ml)
- Meßzylinder (100ml, 500ml, 1000ml)
- Erlenmeyerkolben (enghals; 50ml, 100ml)
- Pipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)
- Bunsenbrenner

2.2.2.2. Reagenzien

- Hammelblut, konserviert (BAG, Lich)
- Ambozeptor 6000 (Behring)
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Molekulargewicht 203,31)
- $CaCl_2$ (Molekulargewicht 110,99)
- NaCl

- Na-5,5-Diäthylbarbiturat (=Veronal)
- 0,1M Titriplex III-Lösung Titrisol (Fa.Merck)
- 1N HCl
- Gelatine, gepulvert
- Na_2CO_3

2.2.2.3. Puffer- und Vorratslösungen

- Stammlösung VBS (Veronal-buffered-saline, nach Rapp u. Borsos)

  83,0g NaCl und 10,19g Na-5,5-Diäthylbarbiturat wurden aufgelöst in ca. 1,5 Litern destillierten Wassers (2l-Meßkolben). Mit 1N HCl wurde der pH-Wert der Lösung auf 7,35±0,05 eingestellt (etwa 35ml HCl erforderlich). Die langsam hinzugefügte Säure wurde durch kräftiges Schütteln der Lösung verteilt; mit destilliertem Wasser wurde die Lösung auf exakt 2 Liter gebracht. Diese Stammlösung enthielt die fünffache Konzentration des isotonischen Arbeitspuffers und konnte bei 4°C einen Monat aufbewahrt werden.

- EDTA-Stammlösung

  Die Herstellung von 0,1M EDTA-Lösung (pH 7,65) erfolgte durch Auffüllen einer Ampulle Titriplex III-Lösung auf 1000ml. Diese Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt und bis zu 3 Wochen verwendet.

- $MgCl_2/CaCl_2$-Lösung

  Diese Vorratslösung enthielt 1,0M $MgCl_2$ sowie 0,15M $CaCl_2$ und entstand durch Auflösen von 20,33g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ und 1,665g $CaCl_2$ in 100ml aqua dest. Hierbei mußte auf ausreichend schnelles Abwiegen des ungesättigten, hygroskopischen $CaCl_2$ geachtet werden.

2.2.3. Voruntersuchungen zur Methodik

2.2.3.1. Beziehung zwischen Extinktion und Hämoglobinkonzentration

Die Einstellung einer Erythrozytensuspension auf $1x10^9$ Zellen/ml nach Auflösung einer kleinen Teilmenge dieser Suspension mit 0,1%iger Na_2CO_3-Lösung und anschließender photometrischer Messung des Lysats ist in Abschnitt 2.2.4. erläutert.

Für diese Standardisierung sowie für die spätere Bestimmung der prozentualen Hämolyse ist eine lineare Beziehung zwischen der optischen Dichte und der Hämoglobinkonzentration Voraussetzung: Das Lambert-Beer-Bougouer'sche Gesetz $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ erlaubt die photometrische Messung nur in dem Bereich, in dem eine Proportionalität zwischen der Extinktion und der Konzentration eines zu bestimmenden Stoffes gewährleistet ist.

Zur Feststellung einer solchen proportionalen Beziehung wurde folgende Untersuchung durchgeführt:

Ausgehend von einer Suspension des Sediments gewaschener Hammelerythrozyten in Arbeitspuffer (VBS-G-M^{++}, s.2.2.4.) im Verhältnis 1:10 wurden ansteigende Verdünnungen der Erythrozyten im Puffer hergestellt. Diese Verdünnungen wurden anschließend mit 0,1%iger Na_2CO_3-Lösung im Verhältnis 1:14 versetzt und die Extinktionswerte des klaren Lysats bei 546nm photometrisch bestimmt.

Folgende Werte ergaben sich in Doppelansätzen:

Hämoglobinverdünnung (1ml Stammverdünnung +1ml Puffer = 1:20, +2ml Puffer = 1:30 usw.)	Extinktion			Extinktion/ Hb-Verdünnung (Quotient)
	1.Ansatz	2.Ansatz	Mittelwert	
1:20 (=0,05=5%ig)	0,840	0,840	0,840	16,80
1:30	0,568	0,561	0,565	16,94
1:40	0,427	0,422	0,425	17,00
1:60	0,285	0,280	0,283	16,98
1:80	0,215	0,213	0,214	17,12
1:100	0,170	0,170	0,170	17,00
1:120	0,143	0,144	0,144	17,28
1:140	0,121	0,123	0,122	17,08
1:160	0,106	0,108	0,107	17,12
1:180	0,094	0,094	0,094	16,92

Der Quotient von Extinktion und Hämoglobinverdünnung ist konstant und beträgt im Mittel 17,02 mit Abweichungen von höchstens 1,5%. Es besteht somit eine direkte Proportionalität zwischen der Hämoglobinkonzentration und der optischen Dichte.

Setzt man y für die Extinktion und x für die Hb-Verdünnung ein, er-

gibt sich die Beziehung:

$$\frac{y}{x} = \text{konstant} = k \quad \text{oder} \quad y = k \cdot x$$

Faßt man diesen Zusammenhang als Funktionsgleichung auf, so ist deren graphische Darstellung eine Gerade durch den Ursprung des Koordinatensystems:

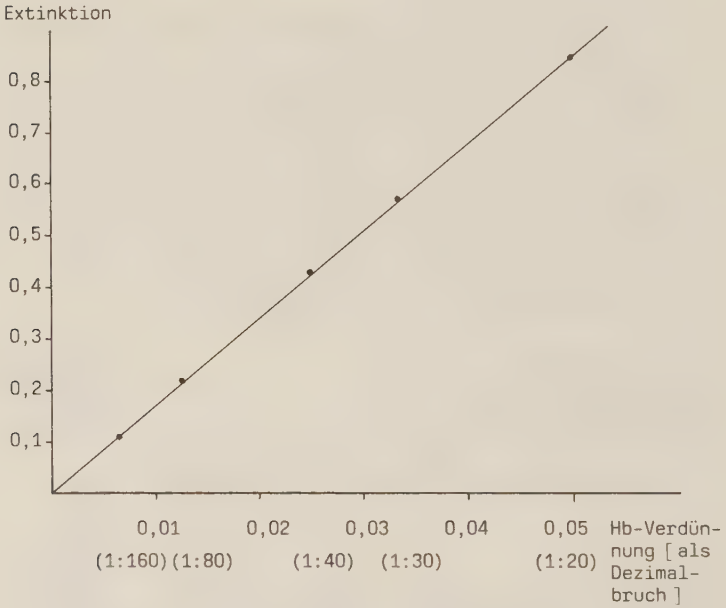


Abb.2 Darstellung der linearen Beziehung zwischen optischer Dichte und Hämoglobinkonzentration (5 Verdünnungsstufen)

2.2.3.2. Bestimmung der optimalen Ambozeptorverdünnung

Zunächst wurde eine geometrische Verdünnungsreihe von Kaninchenambozeptor in VBS-G-M^{++} (s.2.2.4.) hergestellt in den Stufen 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400. Die Hinzugabe von je 1ml dieser Verdünnungsstufen zu jeweils 1ml einer Suspension gewaschener und standardisierter Hammelerythrozyten ($1x10^9$ Zellen/ml) erfolgte im Reagenzglas unter konstantem Schütteln.

200 µl jeder Erythrozyten-Ambozeptor-Verdünnung wurden im Eisbad in Doppelansätzen in Einweg-Reaktionsgefäße (1,5ml) pipettiert,

gefolgt von 1100 µl eisgekühlten Puffers (VBS-G-M^{++}) sowie von 200 µl ebenfalls 0°C-kalter Komplementverdünnung.

Die Komplementverdünnung sollte eine 50-70%ige Hämolyse optimal sensibilisierter Zellen hervorrufen (Kabat u. Mayer; Seyfarth: 40 -80%); dies wurde mit einer 1:40 Verdünnung menschlichen Serums erreicht.

Die Doppelansätze für Leerwert, Serumeigenextinktion und komplette Hämolyse sind wie unter 2.2.4. beschrieben angesetzt worden. Die Inkubation der Gefäße erfolgte 90 Minuten bei 37°C. Während der Inkubationszeit wurden die Ansätze mehrfach auf dem Rotationsmischer geschüttelt.

Die Reaktion wurde im Eisbad abgestoppt und die Extinktionen der nach Zentrifugation der Reaktionsgefäße vorsichtig abpipettierten Überstände photometrisch bestimmt. Nach Korrektur der Extinktionswerte konnte die prozentuale Hämolyse bestimmt werden (s.2.2.4.).

Resultat der Bestimmung:

Ambozeptor-verdünnung	Extinktion 1.Ansatz	2.Ansatz	mittlere Ext. nach Korrektur	% Hämolyse
1:200	0,379	0,382	0,375	55,5 %
1:400	0,381	0,392	0,381	56,4 %
1:800	0,387	0,372	0,374	55,3 %
1:1600	0,343	0,345	0,338	50,0 %
1:3200	0,289	0,281	0,279	41,3 %
1:6400	0,184	0,179	0,176	26,0 %

(mittl.Leerwert : 0,004,
Eigenextinktion: 0,002,
100%-Lysewert : 0,676)

Die graphische Auftragung des errechneten Hämolysegrades gegen die Ambozeptorverdünnung (Abb.3, durchgezogene Linie) zeigt eine Kurve mit Plateaubildung ab einer Ambozeptorverdünnung von etwa 1:600.

Die obere Kurve auf Abb.3 ist das Ergebnis einer Wiederholung des Verfahrens zu einem späteren Zeitpunkt und bestätigt das erste Resultat. Die maximale Hämolyse liegt hier mit 80,7% allerdings etwas zu hoch.

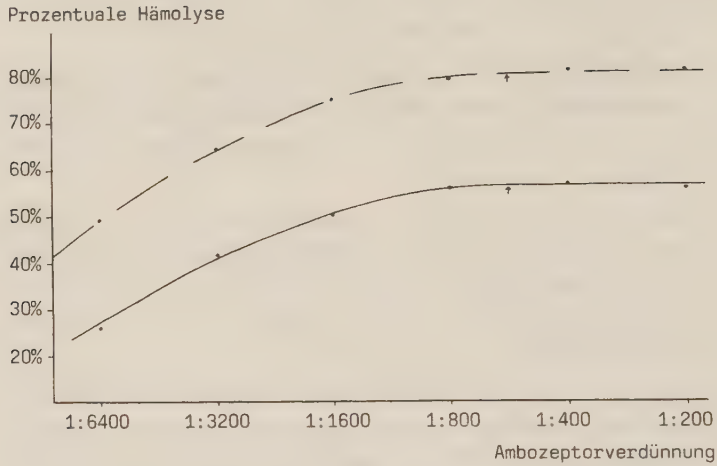


Abb.3 Bestimmung der optimalen Ambozeptorverdünnung (90 Minuten Inkubation bei 37°C, Ansatz mit Serumverdünnung 1:40), Plateaubeginn bei einer Ambozeptorverdünnung von 1:600

Der Beginn der Plateaubildung ist in der Abbildung mit einem Pfeil gekennzeichnet. Von diesem Punkt an ist die hämolytische Antwort unabhängig von einer weiteren Steigerung der Ambozeptorkonzentration. Um den Einfluß von Schwankungen der Ambozeptorkonzentration auf den Komplementtiter auszuschalten, wird zur optimalen Sensibilisierung etwa die doppelte Menge der Ambozeptorkonzentration verwendet, bei der das Plateau beginnt (Williams u. Chase).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Ambozeptorverdünnung von 1:300 benutzt. Bei höheren Konzentrationen erwies sich die Erythrozytenagglutination als Störfaktor.

Ein Wechsel der Ambozeptor-Charge wurde vermieden, alle Bestimmungen erfolgten unter Verwendung desselben Ambozeptors.

2.2.4. Versuchsdurchführung

Eine Übersicht des Ablaufs ist auf Seite 24 gegeben.

2.2.4.1. Herstellung der isotonischen Arbeitspuffer (nach Rapp u. Borsos)

- Isotonischer VBS mit Gelatine sowie Ca^{++} und Mg^{++} (VBS-G-M^{++}; pH 7,3, Ionenstärke 0,15, 0,001M Mg^{++}, 0,00015M Ca^{++})

Zur Herstellung von 1 Liter wurden 200 ml Stamm-VBS (s.2.2.2.) in einen 1000ml-Meßkolben gefüllt, gefolgt von 1ml der 1,0M $MgCl_2$/0,15M $CaCl_2$ enthaltenden Lösung. Mit destilliertem Wasser wurde auf exakt 1000ml aufgefüllt. 1g der Trockengelatine (0,1% in Gewicht/Volumen) wurde nach einigen Minuten Quellung in der Gesamtlösung durch vorsichtiges Erhitzen über dem Bunsenbrenner bei leichtem Schütteln verteilt. Die Gelatine dient der Stabilisierung der Hammelerythrozyten. Der pH-Wert des Gebrauchspuffers soll zwischen 7,2 und 7,4 liegen (Williams u. Chase). Dies wurde nach Fertigstellung jedes neuen Puffers überprüft.

Bis zur Verwendung stand die Lösung im Kühlschrank bei +4°C. Sie wurde wegen einer möglichen bakteriellen Zersetzung der Gelatine (Zwilling; Williams u. Chase) täglich frisch hergestellt.

- Isotonischer VBS mit Gelatine und EDTA (VBS-G-EDTA)

Zuerst wurde ein isotonischer VBS mit Gelatine (0,1%) hergestellt. 9 Teile dieses VBS-G und ein Teil der Stamm-EDTA-Lösung (s.2.2.2.) ergaben den fertigen Puffer, der bei 4°C mindestens eine Woche aufbewahrt werden konnte (Rapp u. Borsos).

2.2.4.2. Behandlung der Hammelerythrozyten

Die Bereitstellung gewaschener und sensibilisierter Erythrozyten erfolgte täglich. Zu diesem Zweck wurden etwa 5ml konserviertes Hammelblut in ein 30ml Zentrifugenglas pipettiert, mit etwa 20 ml VBS-G-EDTA versehen und zentrifugiert (<3000 Umdrehungen pro Minute). Das Sediment wurde - nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes mit der Wasserstrahlpumpe - in wiederum etwa 20ml Puffer durch Schütteln gelöst, 10 Minuten bei 37°C inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschvorgängen (der Überstand nach Zentrifugation sollte hierbei klar sein) wurde eine ca. 5%ige Erythrozytensuspension hergestellt und folgendermaßen auf $1x10^9$ Zellen/ml eingestellt:

0,5ml der Suspension wurden mit 7ml 0,1%iger Na_2CO_3-Lösung im Reagenzglas versetzt und nach Schütteln des Reagenzglases die Ex-

tinktion des klaren Lysats bei 546nm im Photometer gemessen (Einweg-Küvetten mit 1cm Schichtdicke).

Eine Extinktion von 0.704 (±0,005) entspricht einer Zahl von $1x10^9$ Zellen/ml (Williams u. Chase). Die etwas höhere optische Dichte der 5%igen Suspension diente zur Berechnung des zur Korrektur hinzuzufügenden Puffers nach der Formel:

$$V_e = V_a \times \frac{E}{0,704}$$

Nach Einsetzen der gemessenen Extinktion (E) und des Volumens der Erythrozytensuspension (V_a) konnte dieses bekannte Anfangsvolumen auf den errechneten Wert des Endvolumens (V_e) ergänzt werden. Zur Kontrolle des Vorgangs wurde die Extinktion der erhaltenen korrigierten Suspension in der oben beschriebenen Weise gemessen und die Suspension bei eventuellen Abweichungen vom Wert 0,704±0,005 erneut eingestellt.

Erwies sich die Extinktion einer Erythrozytenverdünnung als zu niedrig (unter 0,699), konnte dies durch Zugabe gewaschener Erythrozyten ausgeglichen werden.

Zur Sensibilisierung dieser Erythrozyten wurde ein bestimmtes Volumen der auf $1x10^9$ Zellen/ml eingestellten Suspension (meist 10ml in einem 50ml Erlenmeyerkolben) unter konstantem Schütteln mit exakt der gleichen Menge Ambozeptorverdünnung 1:300 beschichtet. Die Reihenfolge war hierbei unbedingt einzuhalten (Kabat u. Mayer, Williams u. Chase). Nach 20 Minuten Inkubation bei 37°C, Zentrifugation sowie zwei Waschvorgängen in VBS-G-M^{++} zur Entfernung ungebundener Antikörper (Opferkuch u. Cullmann) wurden die sensibilisierten Erythrozyten in VBS-G-M^{++} aufgenommen und auf $5x10^8$ Zellen/ml eingestellt (Extinktion 0,352 bei 546nm entsprechend einer Einstellung auf $1x10^9$ Zellen/ml mit anschließender Verdünnung in Puffer im Verhältnis 1:1).

Die Lösung stand bis zur Verwendung im Kühlschrank.

2.2.4.3. Behandlung des Serums

Frisch abgenommenes Blut soll eine Stunde bei Raumtemperatur stehen (zum vollständigen Ablauf der Gerinnung) und anschließend bei 3000 Umdrehungen/Minute und 4°C etwa 10 Minuten zentrifugiert wer-

den (Seyfarth).

Im Eisbad wurde das Serum in mindestens 4 Stufen verdünnt (1:30, 1:40, 1:50, 1:60), um in der späteren Auswertung wenigstens zwei Werte im Bereich zwischen 20 und 80% Hämolyse erreichen zu können (Kabat u. Mayer). Diese Verdünnungen wurden bis zur unmittelbar anschließenden Herstellung der Ansätze im Eisbad aufbewahrt.

2.2.4.4. Herstellung der Ansätze

Im Eisbad wurden in Einmal-Reaktionsgefäße (1,5ml) unter Verwendung von Eppendorf-Pipetten je 200µl jeder Serumverdünnungsstufe pipettiert und die Doppelansätze anschließend mit 1100µl VBS-G-M^{++} aufgefüllt. Jede Probe enthielt also das gleiche Volumen.

Mit der Zugabe von je 200µl sensibilisierter Hammelerythrozyten ($5x10^8$Zellen/ml) und Durchmischung der Ansätze wurde die Reaktion gestartet.

Je ein Doppelansatz wurde für den Leerwert, die Serumeigenextinktion und die komplette Lyse hinzugefügt:

Leerwert : Das Serum wurde durch Puffer ersetzt (200µl Erythrozytensuspension + 1300µl Puffer),

100%-Lyse: Puffer und Serum wurden durch aqua dest. ersetzt (200µl Erythrozytensuspension + 1300µl aqua dest.),

Serumext.: Die Erythrozyten wurden durch Puffer ersetzt (200µl Serumverdünnung mit der höchsten Konzentration + 1300µl Puffer).

Nach der Hinzufügung der Hammelerythrozyten wurden die Ansätze für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad-Thermostaten inkubiert und im Verlauf der Inkubation etwa 4-5mal durchmischt (Rotationsmischer), um ein Absetzen der Erythrozyten zu vermeiden.

Die Temperatur des Wasserbades wurde kontrolliert und durfte um höchstens ± 0,1-0,2°C schwanken (Kabat u. Mayer).

Nach Abstoppen der Hämolyse im Eisbad und anschließender Zentrifugation (Spezialzentrifuge der Fa.Eppendorf) sind die Reaktionsgefäße wieder ins Eisbad gestellt worden.

Die Überstände der Ansätze wurden mit einer 1000µl Eppendorf-Pipette vorsichtig abpipettiert, in Halbmikroküvetten (lichte Brei-

te 4mm, Schichtdicke 1cm, Mindestfüllvolumen 0,7ml) gefüllt und bei 546nm gegen destilliertes Wasser photometrisch gemessen.

CH50-Hämolyse (Übersicht)

Hammelerythrozyten (täglich frisch hergestellt)	Puffer (täglich frisch hergestellt)	Serum
- Waschen der Erythrozyten in Arbeitspuffer - Einstellen auf $1x10^9$ Zellen/ml durch photometrische Messung der aufgelösten Zellen bei 546nm - Sensibilisierung der standardisierten Erythrozytensuspension mit der gleichen Menge Ambozeptorverdünnung 1:300; Inkubation bei 37°C für 20 Min., Waschen der sensibilisierten Erythrozyten - Einstellen auf $5x10^8$ Zellen/ml	Arbeitspuffer (VBS-G-M^{++}) - Verdünnung der VBS-Stammlösung in aqua dest. im Verhältnis 1:5 (Ionenstärke 0,15) - Hinzufügen der optimalen Menge von $MgCl_2$ und $CaCl_2$ (0,001M Mg^{++}, 0,00015M Ca^{++}) - Auflösen von 0,1% Gelatine durch vorsichtiges Erhitzen und Mischen - Kontrolle des pH-Wertes (zwischen 7,2 und 7,4)	Herstellung von Serumverdünnung in mind. 4 Stufen (zw. 1:20 und 1:80) - 1:20 = 100µl Serum + 1,9ml Puffer - 1:30 = 100µl Serum + 2,9ml Puffer usw. Aufbewahren der Verdünnungen im Eisbad bis zur Verwendung

200µl | 1100µl | je 200µl

Im Eisbad: Doppelansatz je 1,5ml

Doppelansätze für Leerwert, komplette Lyse und Serumeigenextinktion

- Inkubation für 60 Min. bei 37°C (mehrmaliges Durchmischen)
- Abstoppen der Reaktion im Eisbad
- Zentrifugation
- Photometrische Messung des vorsichtig abpipettierten Überstandes bei 546nm und 1cm Schichtdicke
- Auswertung u. Bestimmung des Komplementtiters

2.2.5. Auswertung der Versuchsergebnisse

Das Mittel der Extinktionswerte der Doppelansätze wurde nach Korrektur, also nach Subtraktion von Leerwert sowie Serumeigenextinktion, durch die mittlere Extinktion der beiden Ansätze für die komplette Hämolyse dividiert. Die Hämolyse des Leerwertes durfte nicht mehr als 1-2% betragen (Kabat u. Mayer; Williams u. Chase).

Die so erhaltene prozentuale Hämolyse (y) der einzelnen Serumverdünnungsstufen bildete nach Aufsuchen des Wertes y/1-y in der Tabelle bei Mayer (Kabat u. Mayer) in Anwendung der logarithmisch umgeformten von Krogh'schen Gleichung

$$(A) \quad \log x = \log K + \frac{1}{n} \log \left(\frac{y}{1-y}\right) \quad \text{oder}$$

$$(B) \quad \log \left(\frac{y}{1-y}\right) = n \log x - n \log K$$

die Grundlage der Ermittlung des Komplementtiters (s.2.2.1.):

Trägt man in Anwendung der Formel (B) die unabhängig variablen Werte von log x (Komplementkonzentration x hier definiert als reziproke Serumverdünnung) gegen die Werte von log(y/1-y) graphisch auf (log x auf der Abszisse, log y/1-y auf der Ordinate), so ergibt sich eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der Abszisse der Logarithmus des zu ermittelnden Komplementtiters ist. An diesem Punkt (y = 0,5, log y/1-y = 0) gilt: log x = log K; der Logarithmus der reziproken Serumverdünnung entspricht hier also dem Logarithmus einer CH50-Einheit.

Die Steigung dieser Geraden wird durch n repräsentiert. Da die reziproke Serumverdünnung als Komplementmenge x in die Formel eingesetzt wird, handelt es sich um eine negative Steigung.

Der dargestellte Auswertungsvorgang (s.Zwilling; Williams u. Chase) wird im folgenden an einem Beispiel verdeutlicht:

Patient E.R., weiblich

Serum-verd.	log ($S\text{-}Verd^{-1}$)	Extinktion 1.Mess.	2.Mess.	korr.Ext-Mittel	$y(\frac{\%\text{-Lyse}}{100})$	$\frac{y}{1-y}$	$\log(\frac{y}{1-y})$
1:30	1,477	0,540	0,531	0,526	0,792	3,808	0,581
1:40	1,602	0,313	0,335	0,314	0,473	0,898	-0,047
1:50	1,699	0,177	0,175	0,166	0,250	0,333	-0,478
1:60	1,778	0,086	0,085	0,076	0,115	0,130	-0,886

Leerwert: 0,005 (0,003/0,006), Hämolyse des Leerwertes: 0,75%

Serumext: 0,005 (0,005/0,004)

100%-Lyse: 0,664 (0,656/0,671)

Die aus diesen Werten ableitbare Gerade, deren Funktionsgleichung oben angegeben ist - Gleichung (B) -, wird in Abb.4 dargestellt.

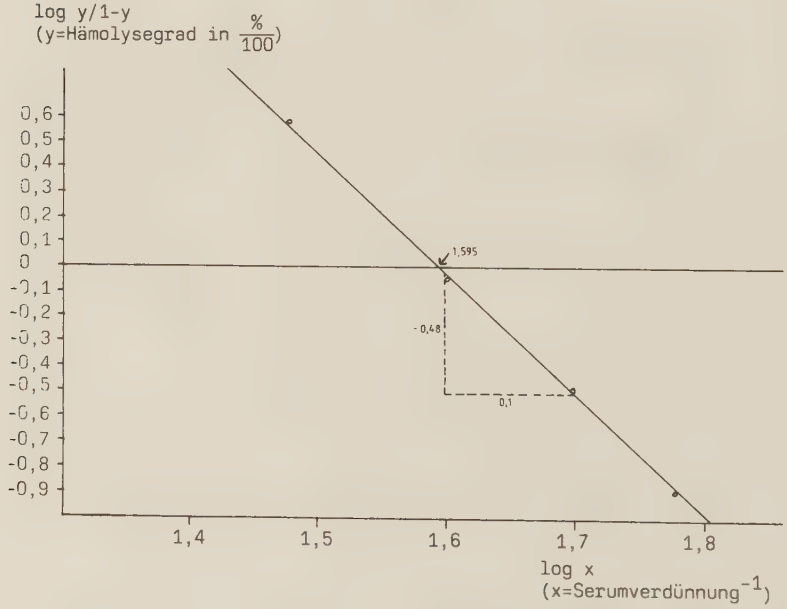


Abb.4 Auswertung der Versuchsergebnisse einer CH50-Hämolyse (60 Minuten Inkubation bei 37°C) durch Ermittlung des Schnittpunktes der Geraden nach Funktionsgleichung (B) mit der x-Achse; dieser liegt hier bei 1,595, somit enthält das Serum 39,36 CH50-Einheiten/ml.

Der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse liegt bei 1,595. Diese Zahl ist der Logarithmus einer reziproken Serumverdünnung von 39,36 (zur Basis 10). Die Aktivität einer Serumverdünnung von 1:39,36 beträgt somit 1 CH50-Einheit, und das Serum enthält 39,36 CH50-Einheiten/ml.

Der Anstieg der Geraden (=n) beträgt -4,8 (Höhendifferenz/Horizontalentfernung = -0,48/0,1, s.Abb.4).

Der Quotient 1/n, hier also 1/-4,8, entspricht mit seinem absoluten Betrag von 0,208 dem bei Mayer angegebenen Wert (0,2±0,02, s.2.1.).

Die graphische Auftragung einer Ausgleichsgeraden im Koordinatensystem durch mindestens drei Punkte im Bereich zwischen 10 und 90% Hämolyse (wie oben erläutert) wurde in der vorliegenden Arbeit ersetzt durch die Auswertung mit einem elektronischen Rechner (Texas Instruments 59).

Dieser enthält als festes statistisches Programm unter anderem die lineare Regression, also die Anpassung einer Geraden an eingegebene Datenpunkte. Diese erfolgt nach der Kleinstquadratmethode, bei welcher die Summe der Quadrate der Abweichungen der tatsächlichen Datenpunkte von der besten Anpassungsgeraden ein Minimum beträgt.

Da der Rechner den Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse berechnet, müssen die Achsen im Vergleich zur Abb.4 vertauscht werden; Funktionsgleichung ist hier die oben angegebene Form (A) der von Krogh'schen Gleichung. Der Rechner gibt außerdem die Steigung der Geraden (hier: 1/n) sowie den Korrelationskoeffizienten an. Der Korrelationskoeffizient zeigt an, wie gut die angepaßte Gerade tatsächlich den Daten angenähert ist, und liegt zwischen -1 und +1, mit perfekter Korrelation bei ±1.

Im erläuterten Beispiel ergibt sich rechnerisch der Schnittpunkt bei 1,596; der wie oben abgeleitete Komplementtiter beträgt 39,45 Einheiten/ml. Die Gerade hat einen Anstieg von -0,207, der Korrelationskoeffizient liegt bei -0,9997.

Diese Auswertung ist in Abb.5 graphisch dargestellt.

Der Rechner ermöglichte auch die Bestimmung der dekadischen Logarithmen von (x) und (y/1-y).

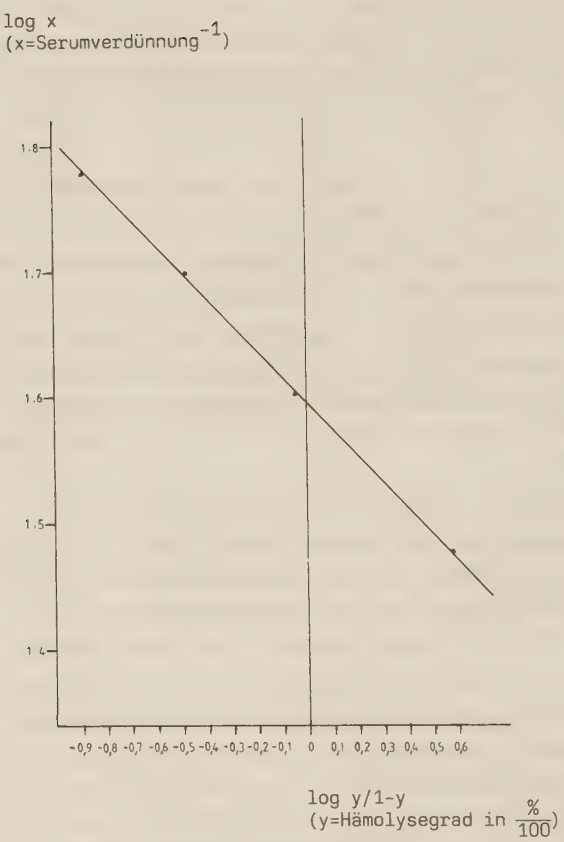


Abb.5 Auswertung der CH50-Hämolyse
nach Gleichung (A) analog Abb.4

Eine andere Möglichkeit der Auswertung wäre die Auftragung der Werte von (x) und (y/1-y) auf doppelt logarithmischem Papier (y/1-y auf der Abszisse, x auf der Ordinate).

Steht nur ein Meßergebnis zur Verfügung, kann die Auswertung über einen Umrechnungsfaktor erfolgen. Dieser ist aus der von Krogh'schen Gleichung abgeleitet und gilt nur für 1/n=0,2 (Kabat u. Mayer).

2.3. CH100-Methodik

2.3.1. Vorbemerkungen

Die Komplementaktivität wurde durch radiale Diffusion von Serum auf standardisierten Bestimmungsplatten (Quantiplate-K der Fa. Biotest) und hierbei erfolgende Auflösung Hämolysin-sensibilisierter Hammelerythrozyten in gepuffertem Kochsalzagarosegel quantitativ bestimmt. Aus dem Ringdurchmesser - in einem Betrachtungsgerät auf 1/10mm genau bestimmt - konnte nach Erstellen einer Referenzlinie der Komplementtiter auf semilogarithmischem Auswertpapier ermittelt werden.

Der Arbeitsablauf folgte der Arbeitsanleitung der Fa. Biotest.

2.3.2. Material

- Quantiplate-K
- Referenzserum-K, lyophilisiert, auf CH100-Einheiten eingestellt (1 CH100-Einheit lysiert $2x10^8$ sensibilisierte Hammelerythrozyten bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Stunde Inkubation bei 37°C.)
- Pipetten (5µl)
- Betrachtungsgerät
- Semilogarithmisches Millimeterpapier

2.3.3. Behandlung der Seren, Durchführung der Immundiffusion

Für die Gewinnung frischer Seren gelten die unter 2.2.4.3. ausgeführten Grundsätze.

Zur Erstellung der Bezugslinie einer Diffusionsplatte wurde das Referenzserum nach Auflösung mit 0,5ml destilliertem Wasser unverdünnt sowie 1+1 und 1+4 mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt in 5µl-Portionen auf die Stellen 1, 2 und 3 aufgetragen. Die Platte ist vorher, noch in der Kunststoffhülle, auf Raumtemperatur gebracht worden.

Die übrigen Auftragsstellen wurden mit je 5µl der zu untersuchenden Seren sowie eines Kontrollserums (Serum eines Gesunden) versehen.

Die verschlossene Platte wurde zum Ablauf der Diffusion mit der Oberseite nach unten in der Kunststoffhülle für 6 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.3.4. Auswertung der Versuchsergebnisse

Mit dem Betrachtungsgerät wurden die Ringdurchmesser der auf der Platte erfolgten Hämolyse auf 1/10mm genau abgelesen. Zur Erstellung der Bezugsgeraden wurden die Ringdurchmesser der Referenzserumverdünnungen (x-Achse) gegen die angegebenen CH100-Einheiten/ml (y-Achse) auf dem semilogarithmischen Millimeterpapier aufgetragen und die drei Punkte durch eine Ausgleichsgerade verbunden.

Der CH100-Wert eines untersuchten Serums war - nach Aufsuchen des Ringdurchmessers auf der x-Achse und der Bezugsgeraden - auf der y-Achse ablesbar.

Dieser Auswertungsvorgang wird nachfolgend in Abb.6 an Hand eines Beispiels verdeutlicht.

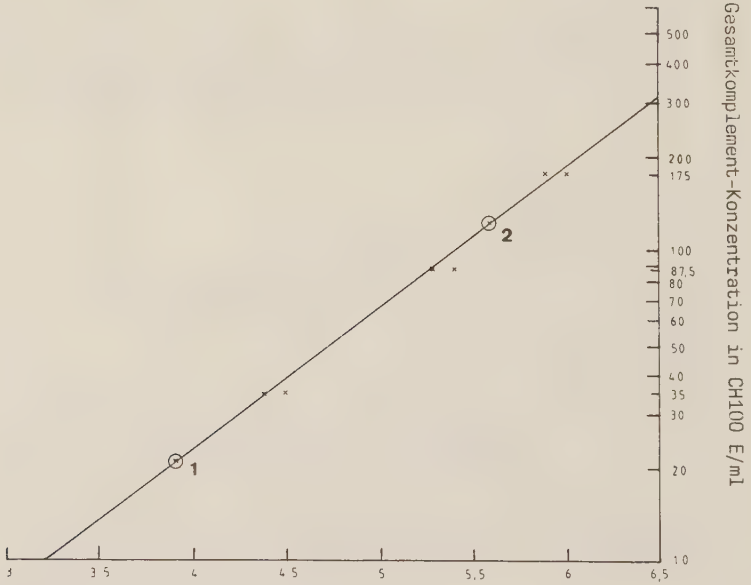


Abb.6 Beispiel für die graphische Ermittlung des CH100-Titers: Die Bezugsgerade wird aus den drei Meßwerten der Referenzserum-Verdünnungen erstellt (jeweils Doppelbestimmung). Die mit ⊙ bezeichneten Meßwerte von zwei Patientenseren ergeben die Ablesungen
Probe 1 = 21 U/ml und Probe 2 = 120 U/ml
(Normbereich 30 bis 110 U/ml).

2.4. Zusammenfassung der methodischen Voraussetzungen

Die aktuelle hämolytische Komplementgesamtaktivität wurde bei beiden in der Arbeit verwendeten Methoden auf der Grundlage der Auflösung spezifisch sensibilisierter Hammelerythrozyten durch den zu ermittelnden Komplementgehalt des getesteten Serums bestimmt (klassischer Aktivierungsweg).

Hierbei gibt der CH50-Titer die zur Auflösung der Hälfte der eingesetzten Erythrozyten erforderliche Komplementmenge in Einheiten/ml (U = units/ml) an. Durch Standardisierung der Versuchsbedingungen nach Mayer (s.2.2.) erhält man Werte, die mit den in anderen Laboratorien erzielten Resultaten vergleichbar sind. Obwohl eine Variabilität der Zahl der absoluten hämolytischen Einheiten in bezug auf den Zeitpunkt der Bestimmung und auf das die Bestimmung durchführende Labor vorauszusetzen ist, wurde in verschiedenen Untersuchungen eine bemerkenswerte Konstanz der Komplementtiter festgestellt (s.hierzu die Beiträge von L.v.Es und W.Opferkuch et al. in 'Clinical Aspects of the Complement System').

Im Rahmen der Untersuchung von Opferkuch et al. ergab sich für 603 Seren gesunder Personen ein mittlerer CH50-Wert von 36,7±8,4 ($\bar{x}$±1s). Die Werte für die männlichen und weiblichen Versuchspersonen zeigten keine statistisch signifikanten Abweichungen voneinander. 98% der Werte lagen im Bereich zwischen 19,5 und 60 U/ml. Die Bestimmung des methodischen Fehlers der CH50-Titration erbrachte einen mittleren Variationskoeffizienten von 7,25%.

R.Snyderman und G.A.McCarthy geben für ihr Labor eine leicht differierende Verteilung der Komplementtiter von 1348 Bestimmungen an; die Werte liegen etwas höher. Der Normbereich wird zwischen 37 und 55 Einheiten/ml definiert, hier liegen 46,3% der Werte (in 'Clinical Aspects of the Complement System').

Im Labor von H.Gewurz und L.A.Suyehira gelten 20-40 U/ml als Norm (in 'Manual of Clinical Immunology'); in der Klinischen Pathophysiologie (Siegenthaler) sind als Normwertangabe 25-50 U/ml zu finden.

Unter Berücksichtigung der Differenz dieser Angaben wurde in der vorliegenden Arbeit ein weitgefaßter Normalbereich zwischen 25 und 55 Einheiten/ml zugrundegelegt.

Das Zurückgreifen auf die Literaturangaben unter Verzicht auf die Erstellung eines eigenen Normbereiches erfolgte aufgrund der verhältnismäßig geringen Größe des Kollektivs untersuchter Seren.

Für die CH100-Methodik wird von Biotest ein Normbereich von 45-60 Einheiten/ml angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde ein weitgefaßter Normalbereich zwischen 30 und 110 Einheiten/ml zugrundegelegt.

3. Ergebnisse der vergleichenden Messung

3.1. Erläuterung zu den Abschnitten 3.2. bis 3.4.

In den Abschnitten 3.2. und 3.3. sind die Ergebnisse der parallel durchgeführten CH100- und CH50-Bestimmung nebeneinander aufgeführt. Hierbei sind die CH50-Werte gerundet, die Angabe mit 2 Stellen hinter dem Komma erfolgt in Klammern.

Insgesamt wurden 122 Einzelseren untersucht. Die erhaltenen Titerpaare sind nach dem Meßergebnis der CH100-Hämolyse - jeweils geordnet nach ansteigenden CH100-Werten - aufgeteilt. Hierbei zeigen 60 Seren einen normalwertigen CH100-Titer, 13 einen erhöhten und 49 einen erniedrigten CH100-Titer. Die Seren mit signifikant erniedrigtem CH100-Titer stammen von Patienten, bei denen eine immunpathologische Erkrankung mit Komplementaktivierung (meist viszeraler Lupus erythematodes bzw. Immunkomplex-Nephritiden verschiedener Primärätiologie) zu vermuten war.

Zur Beurteilung des Zusammenhangs zwischen den beiden Meßgrößen wurden die Ergebnisse als Gesamtkollektiv in Abb.7 graphisch dargestellt. Hierbei ist die Abszisse in CH100-Einheiten eingeteilt, die Ordinate in CH50-Einheiten. Für jedes Serum wurde im Koordinatensystem das zugehörige Wertepaar (x,y) eingezeichnet, das jeweils den CH100-Wert (x) und den CH50-Wert (y) angibt.

3.2. Ergebnisse der vergleichenden Messung im physiologischen Bereich (60 untersuchte Seren)

Patient (Geschlecht)	CH100-Titer (in U/ml)	CH50-Titer (in U/ml)	
K-G.B. (m)	32	38	(37,84)
K.P. (w)	33	33	(33,04)
H.R. (w)	34	37	(36,60)
M.S. (w)	34	20	(19,72)
H.S. (m)	34	33	(33,04)
H.G. (m)	34	32	(32,36)
E.H. (m)	36	40	(39,90)
H.K. (w)	37	44	(44,06)
C.B. (w)	38	39	(39,17)
E.B. (w)	38	25	(25,18)
R.D. (w)	38	33	(33,19)
G.P. (w)	39	50	(49,89)
B.H. (w)	40	41	(40,55)
L.L. (w)	40	38	(37,67)
F.M. (w)	41	49	(49,32)
H.S. (w)	42	33	(32,73)
A.K. (m)	42	46	(46,13)
C.J. (w)	42	35	(34,67)
H.H. (w)	43	36	(35,73)
J-Y.K. (w)	43	41	(40,83)
A.O-F. (w)	44	33	(33,11)
G.S. (w)	44	40	(39,90)
P.S. (w)	45	44	(43,55)
E.S. (m)	45	61	(61,38)
S.R. (w)	46	41	(41,21)

Patient (Geschlecht)	CH100-Titer (in U/ml)	CH50-Titer (in U/ml)	
E.S. (w)	46	44	(44,26)
E.B. (w)	46	32	(32,21)
K.K. (w)	46	29	(29,44)
T.T. (w)	46	46	(45,92)
H.K. (w)	46	35	(34,67)
K.P. (m)	47	42	(42,17)
G.B. (m)	48	43	(43,05)
M.G. (w)	50	44	(43,85)
B.P. (w)	50	39	(39,45)
K.H. (w)	54	42	(41,78)
A.B. (w)	54	50	(49,77)
M.S. (m)	54	48	(47,97)
A.G. (w)	56	49	(48,75)
D.G. (m)	57	49	(48,53)
H.J. (m)	58	51	(50,82)
E.R. (w)	58	39	(39,45)
M.T. (w)	60	52	(51,64)
L.G. (m)	60	27	(26,79)
E.S. (w)	61	49	(48,98)
S.S. (w)	62	58	(58,34)
E.B. (w)	62	54	(53,58)
K.L. (w)	63	39	(38,99)
G.H. (w)	66	57	(56,62)
P-M.W. (w)	68	50	(49,55)
R.R. (w)	70	41	(40,93)
F.K. (m)	70	58	(57,54)
M.K. (w)	72	63	(62,66)
H.E. (m)	76	43	(42,85)
U.S. (w)	76	52	(51,88)
K.T. (m)	82	49	(48,75)
L.K. (w)	88	64	(63,53)
A.B. (w)	95	42	(42,36)
H.H. (m)	96	50	(50,12)
A.R. (w)	98	56	(55,85)
H.F. (w)	100	41	(40,55)

3.3. Ergebnisse der vergleichenden Messung im pathologischen Bereich

3.3.1. Erhöhte CH100-Titer (13 untersuchte Seren)

Patient (Geschlecht)	CH100-Titer (in U/ml)	CH50-Titer (in U/ml)	
A.H. (m)	110	45	(45,09)
P.P. (m)	110	67	(67,14)
G.K. (m)	110	45	(45,19)
A.G. (w)	110	62	(61,52)
D-E.L. (m)	110	56	(56,23)
H.W. (w)	115	51	(50,82)
M.M. (w)	120	55	(54,83)
F.P. (w)	120	42	(41,69)
H.R. (m)	120	51	(50,70)
G.S. (w)	125	50	(50,35)
L.J. (w)	140	64	(63,97)
G.K. (m)	140	66	(66,07)
H.B. (m)	170	57	(57,41)

3.3.2. Erniedrigte CH100-Titer (49 untersuchte Seren)

Patient (Geschlecht)	CH100-Titer (in U/ml)	CH50-Titer (in U/ml)	
H.S. (m)	<10	k.H.	(= keine Hämolyse nachweisbar)
B.R. (m)	<10 (k.H.)	k.H.	
H.R. (m)	<10 (k.H.)	k.H.	
J.R. (w)	<10	k.H.	
G.H. (m)	<10 (k.H.)	k.H.	
K-H.P. (m)	<10	k.H.	
M.M. (m)	<10	k.H.	
H.S. (m)	<10 (k.H.)	k.H.	
H-J.P. (m)	<10 (k.H.)	k.H.	
H-G.B. (m)	<10 (k.H.)	k.H.	
T.H. (w)	<10	k.H.	
A.S. (m)	<10 (k.H.)	k.H.	
R.K. (m)	14	<10	
T.K. (m)	15	12	(12,45)
R.N. (w)	16	24	(24,27)

Patient (Geschlecht)	CH100-Titer (in U/ml)	CH50-Titer (in U/ml)
S.B. (w)	17	14 (14,45)
J.H. (w)	18	37 (37,28)
D.H. (m)	18	12 (11,67)
S.W-S. (w)	18	k.H.
H.F. (w)	18	k.H.
J.P. (m)	18	k.H.
T.T. (w)	19	<10
P.R. (m)	20	k.H.
U.M. (m)	20	11 (10,50)
H.G. (m)	21	14 (14,05)
G.F. (w)	21	k.H.
M.E. (w)	21	11 (10,81)
T.S. (m)	22	20 (20,09)
M.C. (w)	23	16 (16,37)
H.B. (w)	25	12 (11,67)
M.M. (w)	26	29 (28,51)
U.S. (m)	26	<10
P.N. (m)	26	23 (23,07)
M.B. (w)	26	30 (29,51)
J.F. (m)	27	30 (30,06)
C.S. (w)	27	44 (44,46)
M.B. (w)	27	31 (31,12)
H-G.S. (m)	27	19 (18,58)
T.S. (w)	28	25 (24,77)
L.A. (w)	28	47 (46,56)
G.J. (w)	28	16 (16,14)
B.L. (w)	28	29 (28,58)
H.G. (w)	29	<10
E.D. (w)	29	29 (28,97)
E.S. (m)	29	33 (33,19)
M.B. (w)	29	42 (41,88)
A.H. (w)	30	30 (30,27)
E.R. (w)	30	19 (18,75)
E.K. (w)	30	30 (29,99)

3.4. Graphische Darstellung der Ergebnisse

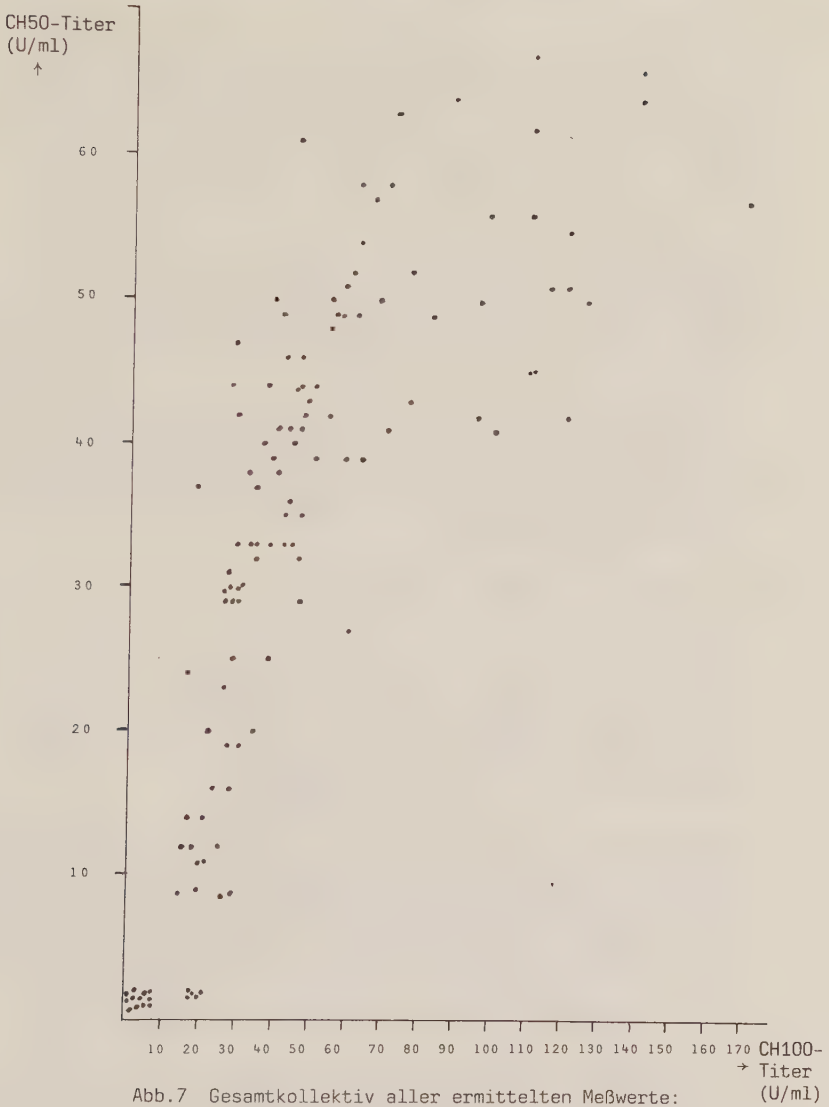


Abb.7 Gesamtkollektiv aller ermittelten Meßwerte: Es zeigt sich eine gute Korrelation der Meßwerte nur in unteren und mittleren Konzentrationsbereichen.

4. Bewertung der Meßergebnisse in einer kritischen Besprechung

4.1. Ausgangssituation

Zur funktionellen Bestimmung des Komplementgehaltes von Serum und anderen Körperflüssigkeiten waren bisher nur aufwendige kinetische Methoden in Gebrauch. Prototyp dieser Verfahren ist die 1961 von Mayer eingeführte Bestimmung der CH50-Einheiten zur Beurteilung der hämolytischen Komplementgesamtaktivität, die als verläßliche Übersichtsmethode nach wie vor Verwendung findet.

Die Wertbemessung der Endpunkthämolyse (CH100-Methodik) hingegen ist bis heute als funktionelles Meßverfahren nicht anerkannt, obwohl sie in der Laborpraxis - ähnlich der proteinchemischen Bestimmung von Einzelkomponenten mit Hilfe der radialen Immundiffusion - wesentlich einfacher zu handhaben ist. Die in Kapitel 3 aufgelisteten Meßergebnisse der parallel durchgeführten Bestimmung der CH50- und CH100-Werte von 122 Serumproben zeigen jedoch eine überraschend hohe Übereinstimmung der beiden Verfahren, sodaß die Möglichkeit zu einer neuen Bewertung der CH100-Methodik gegeben ist.

4.2. Regressionsanalyse mittels Computerprogramms

Die graphische Darstellung des Gesamtkollektivs in Abb.7 zeigt eine Punktwolke, die im Bereich von y (= CH50 in U/ml) > 40 in stärkerem Maße streut und zu höheren x-Werten, also CH100-Titern, verschoben erscheint. Demnach besteht im mittleren und im niedrigen Titerbereich eine offensichtlich bessere Korrelation der mit den beiden Methoden ermittelten Meßwerte als im oberen Titerbereich.

Zur statistischen Beurteilung des Zusammenhangs beider Meßgrößen wurde eine Regressionsanalyse mittels Computerprogramms durchgeführt. Hierzu wurde das Kollektiv aufgrund des oben beschriebenen Gesamtverhaltens aufgeteilt und das Computerprogramm für die lineare Regression für den klinisch besonders relevanten Bereich CH50 < 40 U/ml (erniedrigte Werte und unterer Normbereich) und den Bereich CH50 > 40 U/ml (oberer Normbereich und erhöhte Werte) getrennt angewendet.

Die ausgedruckten Punktwolken und die errechneten Korrelationsdaten sind in Abb.8 und 9 angegeben, wobei wie in Kapitel 3 die CH100-Werte auf der Abszisse, die Werte der CH50-Hämolyse auf der Ordinate eingetragen sind. Die eingegebenen Datenpaare sind der Tabelle der jewei-

ligen Abbildung zu entnehmen. Berücksichtigt wurden nur Daten mit einem Wert von ≥ 10 U/ml.

Aus der Regressionsanalyse ergibt sich für den unteren Bereich der Meßwerte (CH50 < 40 U/ml) eine relativ gute Korrelation mit einer Wertbemessung des Korrelationskoeffizienten r = 0,648 (2 P < 0,001). Im oberen Bereich der Meßwerte (CH50 > 40 U/ml) liegt der Korrelationskoeffizient r mit r = 0,494 vergleichsweise schlechter als der für den unteren Bereich ermittelte.

Somit bestätigt die Regressionsanalyse mittels Computerprogramms das in Abb.7 graphisch veranschaulichte Gesamtergebnis. Eine weitgehende Übereinstimmung der Meßwerte besteht für die beiden miteinander verglichenen Bestimmungsmethoden nur im unteren und mittleren Titerbebereich.

Zusätzlich zu dieser statistischen Auswertung der Meßergebnisse soll die 9-Feldertafel in Abb.10 einen vom Einzelwert unabhängigen optischen Eindruck über die Beziehung der beiden Methoden vermitteln. Jedes Wertepaar des Gesamtkollektivs wurde - unter Vernachlässigung der exakten Titerhöhe - dem entsprechenden Feld zugeordnet.

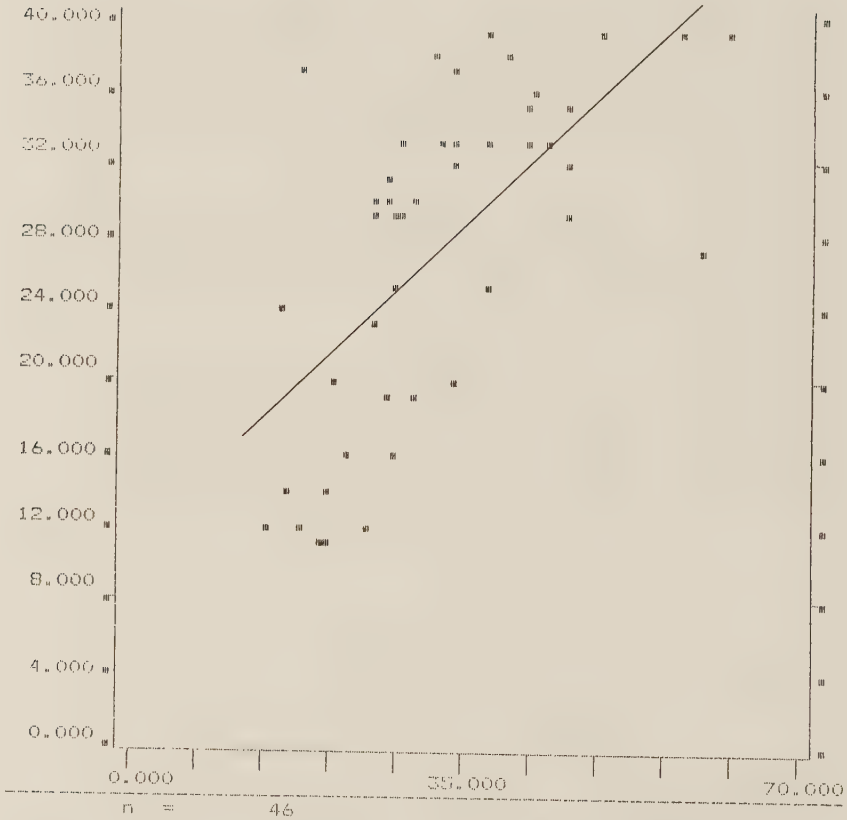
Bsp.: Pat. D.H. - CH100-Titer: 18 U/ml
CH50-Titer: 12 U/ml

Bei diesem Patienten ist also eine Verminderung sowohl des CH100- als auch des CH50-Titers ermittelt worden. Dieser Befund wird dementsprechend mit einem Kreuz im linken unteren Feld dokumentiert.

Die Abbildung zeigt, daß der größte Teil der Werte in dem für beide Methoden übereinstimmend erniedrigten und normalwertigen Feld liegt. Eine erhebliche Diskrepanz in der Aussage, also ein Serum, daß mit einer Methode erniedrigt und mit der anderen erhöht gemessen wurde, ist nicht aufgetreten.

*** Lineare Regression ***

CH50 < 40 U/ML



n	=	46			
Mw (x)	=	32.652	Mw (y)	=	27.413
Stdabw. (x)	=	11.953	Stdabw. (y)	=	8.918

Regressionsgerade: y = a + b*x

(A.d.St. x	=	0.000)	ist y	=	11.090)
a	=	11.090	b	=	0.500
r	=	0.648	r*r	=	0.419
Stdabw. (r)	=	0.115	Stdabw. (b)	=	0.089
Standard-Schätzfehler			Sy.x	=	6.872

Abb.8 Regressionsgerade und Korrelationsdaten des Wertekollektivs CH50 < 40 U/ml (x = CH100-Titer in U/ml; y = CH50-Titer in U/ml). Die statistische Beurteilung ergibt mit einer Wertbemessung von r = 0,648 eine relativ gute Korrelation der Meßwerte.

*** LINEARE REGRESSION ***

CH50 < 40 U/ML

Eingegebene Wertepaare: (x; y)

1.	15.0000	16.0000	17.0000	18.0000	18.0000	20.0000	21.0000	21.0000
	12.0000	24.0000	14.0000	37.0000	12.0000	11.0000	14.0000	11.0000
9.	22.0000	23.0000	25.0000	26.0000	26.0000	26.0000	27.0000	27.0000
	20.0000	16.0000	12.0000	29.0000	23.0000	30.0000	30.0000	31.0000
17.	27.0000	28.0000	28.0000	28.0000	29.0000	29.0000	30.0000	30.0000
	19.0000	25.0000	16.0000	29.0000	29.0000	33.0000	30.0000	19.0000
25.	30.0000	58.0000	60.0000	63.0000	32.0000	33.0000	34.0000	34.0000
	30.0000	39.0000	27.0000	39.0000	38.0000	33.0000	37.0000	20.0000
33.	34.0000	34.0000	38.0000	38.0000	38.0000	40.0000	42.0000	42.0000
	33.0000	32.0000	39.0000	25.0000	33.0000	38.0000	33.0000	35.0000
41.	43.0000	44.0000	46.0000	46.0000	46.0000	50.0000		
	36.0000	33.0000	32.0000	29.0000	35.0000	39.0000		

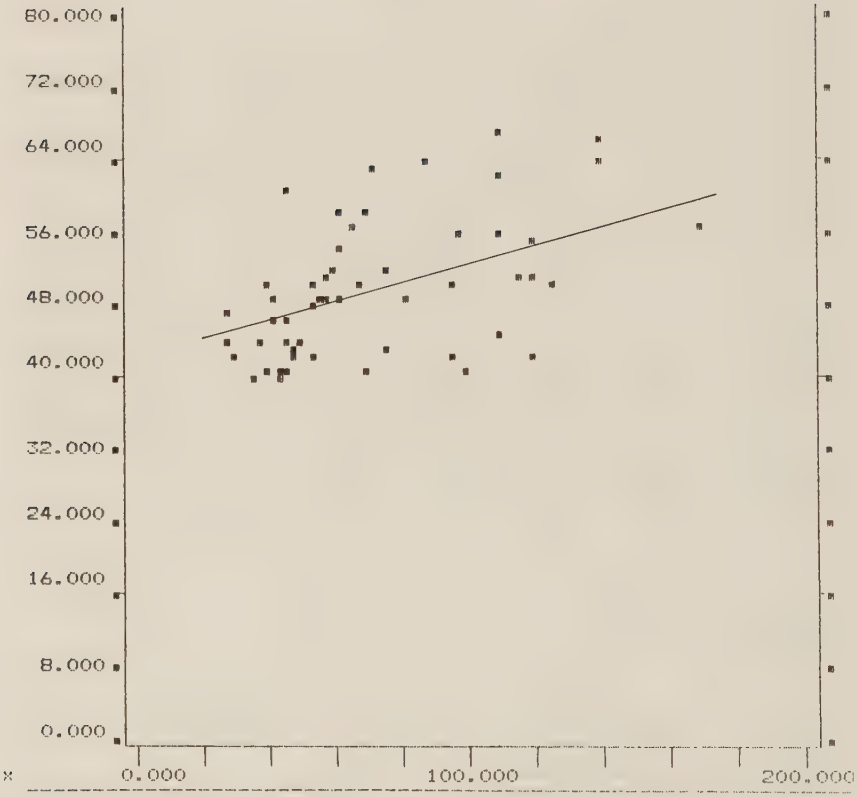
Errechnete Summen:

n =	46		
Sx =	1502.00000	Sy =	1261.00000
Sxx =	55050.00000	Syy =	38147.00000
Sxy =	44177.00000		

Zusatztabelle zu Abb.8 Gesamtübersicht über die eingegebenen Wertepaare zum Kollektiv CH50 < 40 U/ml

***** Lineare Regression *****

CH50 > 40



n	=	55			
Mw (x)	=	72.982	Mw (y)	=	49.600
Stdabw. (x)	=	33.834	Stdabw. (y)	=	7.472

Regressionsgerade: y = a + b*x

(A.d.St. x	=	0.000	ist y	=	41.646)
a	=	41.646	b	=	0.109
r	=	0.494	r*r	=	0.244
Stdabw. (r)	=	0.119	Stdabw. (b)	=	0.026
Standard-Schätzfehler			Sy.x	=	6.560

Abb.9 Regressionsgerade und Korrelationsdaten des Wertekollektivs CH50 > 40 U/ml (x = CH100-Titer in U/ml; y = CH50-Titer in U/ml). Mit einer Wertbemessung von r = 0,494 ist die Korrelation der Meßwerte vergleichsweise schlechter als in den niedrigen Titerbereichen.

*** LINEARE REGRESSION ***

CH5O > 40

Eingegebene Wertepaare: (x; y)

1.	110.0000	110.0000	110.0000	110.0000	110.0000	115.0000	120.0000	120.0000
	45.0000	67.0000	45.0000	62.0000	56.0000	51.0000	55.0000	42.0000
9.	120.0000	125.0000	140.0000	140.0000	170.0000	36.0000	37.0000	39.0000
	51.0000	50.0000	64.0000	66.0000	57.0000	40.0000	44.0000	50.0000
17.	40.0000	41.0000	42.0000	43.0000	44.0000	45.0000	45.0000	46.0000
	41.0000	49.0000	46.0000	41.0000	40.0000	44.0000	61.0000	41.0000
25.	46.0000	46.0000	47.0000	48.0000	50.0000	54.0000	54.0000	54.0000
	44.0000	46.0000	42.0000	43.0000	44.0000	42.0000	50.0000	48.0000
33.	56.0000	57.0000	58.0000	60.0000	61.0000	62.0000	62.0000	66.0000
	49.0000	49.0000	51.0000	52.0000	49.0000	58.0000	54.0000	57.0000
41.	68.0000	70.0000	70.0000	72.0000	76.0000	76.0000	82.0000	88.0000
	50.0000	41.0000	58.0000	63.0000	43.0000	52.0000	49.0000	64.0000
49.	95.0000	96.0000	98.0000	100.0000	27.0000	28.0000	29.0000	
	42.0000	50.0000	56.0000	41.0000	44.0000	47.0000	42.0000	

Errechnete Summen:

n =	55		
Sx =	4014.00000	Sy =	2728.00000
Sxx =	354766.00000	Syy =	138324.00000
Sxy =	205832.00000		

Zusatztabelle zu Abb.9 Gesamtübersicht über die eingegebenen Wertepaare zum Kollektiv CH5O > 40 U/ml

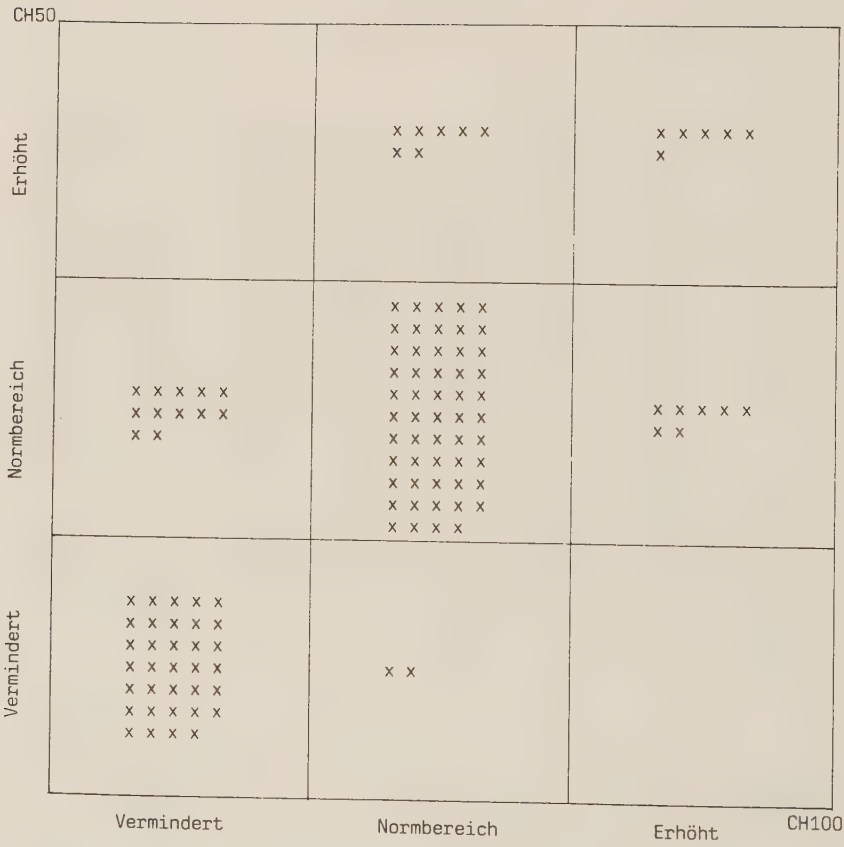


Abb.10 9-Feldertafel: Eintragung der 122 Wertepaare in das entsprechende Feld der beiden Titerbereiche (Normbereich CH50: 25-55 U/ml, CH100: 30-110 U/ml). Das hier optisch verdeutlichte Gesamtergebnis der Untersuchungen zeigt eine Übereinstimmung der Meßwerte nur in unteren und mittleren, nicht jedoch in oberen Titerbereichen.

4.3. Diskussion

In der Literatur liegt bis heute ein statistisch überprüfter Vergleich von Ergebnissen der beiden Methoden zur Bestimmung der hämolytischen Komplementgesamtaktivität nicht vor.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Meßergebnisse lassen unter Berücksichtigung der Regressionsanalyse mit den hierbei errechneten Werten für den Korrelationskoeffizienten r und das Bestimmtheitsmaß r^2 eine überraschende Übereinstimmung der parallel ermittelten Meßergebnisse im unteren und mittleren Titerbereich erkennen. Gerade diese Bereiche sind klinisch von besonderem Interesse, da die Komplementverminderung auf einen Komplementverbrauch im Rahmen eines immunpathologischen Prozesses hinweist.

Wie oben ausgeführt, ist die hämolytische Komplementaktivität grundsätzlich abhängig von

der Konzentration (und Fragilität) der Erythrozyten,
der Art und Menge des zur Sensibilisierung verwendeten Antikörpers,
der Ionenstärke des Reaktionssystems,
den Konzentrationen der Magnesium- und Calcium-Ionen,
dem pH-Wert,
der Reaktionszeit,
dem Reaktionsvolumen und
der Temperatur des untersuchten Ansatzes.

Bei sorgfältiger Kontrolle aller dieser Faktoren, Verwendung geeigneter Standardproben sowie bei Erstellung eines eigenen Normbereiches für das jeweilige Labor ist die Bestimmung der hämolytischen Komplementgesamtaktivität auch für wissenschaftliche Belange eine gute Übersichtsmethode. Sie spricht jedoch erst bei einer erheblichen Verminderung des Komplementgehaltes der untersuchten Proben an. Ein derart massiver Befund läßt sich anscheinend auch mit dem "gröberen Raster" der als ungenauer geltenden CH100-Methodik erheben, wodurch die Vergleichbarkeit der Methoden im unteren Meßbereich erklärbar wäre. Die stärkere Divergenz im höheren Meßbereich dürfte auf die dann zum Tragen kommende Ungenauigkeit der CH100-Methodik zurückzuführen sein. Hinzu kommen Ungenauigkeiten, die sich aus der semilogarithmischen Auftragung der Meßergebnisse herleiten: eine bestimmte Diffe-

renz der abgelesenen Ringdurchmesser ist im höheren Meßbereich mit einer wesentlich größeren Titerveränderung verbunden als im Bereich kleinerer Ringdurchmesser und niedrigerer CH100-Titer.

Aus kritischer wissenschaftlicher Sicht ist einzuwenden, daß insgesamt - obwohl die ermittelten Korrelationsdaten eine Korrelation der beiden Methoden in gewissem Umfang nahelegen - eine enge lineare Abhängigkeit der einzelnen Titerhöhen voneinander nicht nachgewiesen werden konnte. Zudem trennt die Aufteilung des Kollektivs aller Wertepaare ≥ 10 U/ml in 2 Teilkollektive die besser korrelierenden von den weniger übereinstimmenden Werten.

Somit ist in kritischer Bewertung des Gesamtergebnisses festzustellen, daß die CH100-Methodik die Genauigkeit der CH50-Hämolyse nicht erreicht. Sie kann diese daher in wissenschaftlich orientierten Untersuchungen nicht ersetzen. Hierfür sind nach wie vor CH50-Methodik und Komplement-Komponenten-Titration maßgebend.

Demgegenüber ist jedoch noch einmal darauf hinzuweisen, daß in der überwiegenden Mehrzahl der in Abschnitt 3.3.2. aufgelisteten pathologischen Seren mit beiden Methoden übereinstimmend eine signifikante Verminderung der Komplementaktivität festgestellt werden konnte. Daher erscheint es zweckmäßig, zwischen dem wissenschaftlichen Anspruch an einen Methodenvergleich und den für die Verwendung der Methoden im Routinelabor anzuwendenden Kriterien zu unterscheiden.

4.4. Schlußfolgerungen für die Klinik

Die vorliegende Arbeit ist unter der Annahme begonnen worden, daß die Bestimmung des hämolytischen Endpunktes (CH100-Methodik) der CH50-Bestimmung nach Mayer nicht vergleichbar ist. Überraschenderweise zeigte sich innerhalb gewisser Grenzen das Gegenteil: Mit beiden Methoden läßt sich ein erheblicher Komplementverbrauch im Rahmen immunpathogener Folgereaktionen feststellen.

Auch bei sehr kritischer Wertung aller möglichen Einwände ergibt sich hieraus eine Eignung der CH100-Methodik für die klinische Routine. Unter Berücksichtigung anderer laborchemischer Parameter (C3, C4, antinukleäre Faktoren etc.) läßt sich im Rahmen des klinischen Gesamtbildes auch mit der CH100-Methodik eine verläßliche Aussage über Schweregrad und Verlauf der Komplementaktivierung machen.

Durch die beträchtliche Ersparnis an Zeit und Kosten, die die CH100-Bestimmung gegenüber der erheblich aufwendigeren CH50-Methodik ermöglicht, wird für das Routinelabor ein praktikabler Weg der Bestimmung der hämolytischen Komplementgesamtaktivität aufgezeigt.

5. Klinische Einzelbeispiele

Anhand einiger Einzelfälle soll nachfolgend gezeigt werden, wie sich das mit den beiden zu vergleichenden Methoden gemessene Komplementverhalten auf die Diagnostik verschiedener Immunkomplexerkrankungen auswirkt.

a) Patientin E.B.

Bei der Patientin bestand klinisch der Verdacht auf einen Lupus erythematodes.

Befunde:

In der indirekten Immunfluoreszenz wurden antinukleäre Faktoren in hoher Konzentration (> 1:100) sowie Antikörper gegen native Doppelstrang-DNS nachgewiesen. Entsprechend war die DNS-Bindungskapazität signifikant erhöht (> 107,0 E/ml).

Im Komplementverhalten fand sich eine Senkung der dritten Komplementkomponente (Quant.Best.: β_1C/A Globulin [C3] 79 mg/100 ml) sowie übereinstimmend ein mit 25 U/ml grenzwertiger CH50-Titer. Der CH100-Wert hingegen war mit 38 E/ml normwertig.

Eine erhöhte Konzentration zirkulierender Immunkomplexe konnte nicht objektiviert werden.

Beurteilung:

Die 3 Parameter der indirekten Immunfluoreszenz sprechen für einen viszeralen Lupus erythematodes. Die Komplementbestimmungen deuten auf einen Komplementverbrauch im Rahmen der Immunkomplexbildung hin, wobei sich der CH50-Wert allerdings besser in das diagnostische Gesamtbild einfügt als der normwertige CH100-Titer.

b) Patient H.S.

Klinische Verdachtsdiagnose war eine chronische Nephritis.

Vorbefunde:

Die Immunelektrophorese (Quant.Best.: IgA < 16 mg/100 ml, IgG 2191 mg/100 ml, IgM 272 mg/100 ml) zeigte eine chronisch entzündliche Dysproteinämie bei selektivem IgA-Mangelsyndrom. Außerdem konnte eine Konzentrationserhöhung zirkulierender Immunkomplexe festgestellt werden. Eine Immunkomplex-Nephritis war also möglich. Streptokokken-Serologie (ASL-Titer, Anti-Strept-DNase B, Anti-Strept-Hyaluronidase) sowie Komplementbestimmungen (C3, C4, CH100) waren unauffällig.

5 Wochen später war die Nephritis klinisch gebessert. Hier ergaben sich folgende

Befunde:

Immunelektrophorese:

IgA < 16 mg/100 ml
IgG 2791 mg/100 ml
IgM 249 mg/100 ml

Anti-Streptolysin-Titer: 100

Anti-Streptokokken-DNase B: 100

Komplementbestimmungen:

Quant.Best. β_1C/A Globulin (C3) 87 mg/100 ml
Quant.Best. β_1-E-Globulin (C4) 16 mg/100 ml

Hämolytische Komplementaktivität

CH100 < 10 E/ml
CH50 keine Hämolyse nachweisbar

Beurteilung:

Der selektive IgA-Mangel wird erneut bewiesen. Im Unterschied zum Vorbefund ist jetzt anhand der Komplementbestimmungen, insbesondere übereinstimmend nach CH100- und CH50-Methodik, ein starker Komplementverbrauch nachweisbar, der auf immunpathogene Folgereaktionen hinweist. Somit ist die Immunkomplex-Nephritis - soweit serologisch beurteilbar - fast gesichert. Eine definitive Entscheidung erfordert allerdings Nierenbiopsie mit nachfolgender histologischer und vor allem immunhistologischer Auswertung. Nur so

läßt sich endgültig entscheiden, ob Immunkomplexe, die für die Komplementaktivierung auslösend wirksam werden, tatsächlich in glomeruläre Bereiche eingelagert sind und wo diese Einlagerung erfolgt ist. Immunpathologische Folgereaktionen freilich sind aus den angegebenen serologischen Ermittlungen und Analysen des Komplementverhaltens ganz überwiegend wahrscheinlich.

c) Patientin G.J.

Bei dieser Patientin war seit mehreren Jahren ein systemischer Lupus erythematodes bekannt, Antikörper gegen native Doppelstrang-DNS wurden radioimmunologisch immer wieder in starker Konzentrationserhöhung gemessen, Nierenbeteiligung wurde klinisch und nach Nierenbiopsie gesichert und durch immunhistologische Untersuchung präzisiert.

Unter immunsuppressiver Therapie mit Prednison und Azathioprin kam es temporär zu einer weitgehenden Remission. Im Verlauf der nächsten Krankheitsjahre traten aber mehrere neue Schubsituationen auf.

In einer solchen Schubsituation wurden folgende serologische Einzelwerte ermittelt:

Indirekte Immunfluoreszenz:
Nachweis antinukleärer Faktoren weit über 1:100 positiv.
Nachweis von Antikörpern gegen native Doppelstrang-DNS im radioimmunologischen Testverfahren (DNS-Bindungskapazität):
Erhöhung weit über die Normgrenze von 25 E/ml auf hier 107 E/ml.
Gleichzeitiger Nachweis einer sicheren Konzentrationserhöhung zirkulierender Immunkomplexe.

Bei Bestimmung der hämolytischen Komplementaktivierung ergaben sich folgende Werte:

CH100-Hämolyse:	28 E/ml
CH50-Hämolyse:	16 U/ml

Beurteilung:

Bei hoch positivem Titer antinukleärer Antikörper sowie spezifischer Antikörper gegen native Doppelstrang-DNS und einer signifikanten Verminderung der hämolytischen Komplementgesamtakti-

vität (bei beiden Methoden) dürfte ein akuter Schub der Grunderkrankung vorliegen. Die Schubsituation geht auf eine zu starke Reduzierung der immunsuppressiven Therapie zurück. Die Kriterien des Komplementverbrauchs durch neuerliche Komplementaktivierung sind auch hier in repräsentativen Meßwerten erfüllt.

d) Patient H-G.B.

Klinisch bestand der Verdacht auf Glomerulonephritis bei ausgedehnten Pyodermien.

Befunde:

Immunelektrophorese:

IgA 521 mg/100 ml
IgG 1994 mg/100 ml
IgM 193 mg/100 ml
α_2-Makroglobulin 402 mg/100 ml
Haemopexin 73 mg/100 ml
Transferrin 269 mg/100 ml

C-reaktives Protein: nicht nachweisbar
Anti-Streptolysin-Titer: 640 +
Komplementbestimmungen:

C3 121 mg/100 ml
CH100 < 10 E/ml
CH50 keine Hämolyse nachweisbar

Quantitativer Immunkomplex-Nachweis: negativ

Beurteilung:

Die Diagnose einer streptokokkenabhängigen Immunkomplex-Nephritis ist aus der Serologie mit großer Wahrscheinlichkeit abzuleiten (chronisch entzündliche Dysproteinämie, Streptokokkenabhängigkeit und Komplementaktivierung im Gewebe durch wahrscheinlich pathogenetisch wirksame Immunkomplexe). Auch hier zeigt sich der erhebliche Komplementverbrauch gleichermaßen in beiden Methoden.

e) Patientin S.B.

Seit ca. einem Jahr wurde eine Imurek-Behandlung eines gesicherten Lupus erythematodes durchgeführt. Klinisch besteht Verdacht auf Beteiligung der Nieren und des Zentralnervensystems.

Befunde:

Antinukleäre Faktoren (AFN) weit über 1:100 +
Antikörper gegen native Doppelstrang-DNS +
DNS-Bindungskapazität > 107,0 E/ml +
Komplementbestimmungen:
C3 65 mg/100 ml
C4 4,0 mg/100 ml
CH100 17 E/ml
CH50 14 U/ml

Beurteilung:

Bei hoch konzentrierten antinukleären Faktoren und hoher DNS-Bindungskapazität findet sich eine drastische Erniedrigung bei allen durchgeführten Komplementbestimmungen. Auch unter der immunsuppressiven Therapie sind also immunkomplexbedingte Folgeraktionen im Gewebe anzunehmen.

Der Fortbestand einer hochpositiven Serologie mit Nachweis hochkonzentrierter DNS-Antikörper ist auch unter langfristiger immunsuppressiver Therapie bei LED immer wieder beschrieben worden. Er begründet die allgemeine Erfahrung, daß der LED durch Immunsuppression zwar temporär gebessert, aber nicht endgültig geheilt werden kann. Das Aufflammen der Entzündung bleibt möglich, wie es das vorliegende Beispiel deutlich werden läßt.

f) Patient F.M.

14 Tage vor der immunologischen Auswertung bestand eine fieberhafte Streptokokken-Angina. Im Zeitpunkt der Auswertung waren zusätzlich eine Hämaturie und eine Gesichtsödembildung aufgetreten. Eine Hypertonie lag nicht vor.

Befunde:

Antistreptolysintiter: Erhöhung auf 1:800 + (Grenze 1:200 +)
Anti-Streptokokken-DNase B: 1:600 + (Normgrenze 1:200 +)

α_2-Makroglobulin: Erhöhung auf 402 mg/dl (Normgrenze 150-350mg/dl)

Hämopexin: Erniedrigung auf 73 mg/dl (Normgrenze 70-130mg/dl)

(Hier kann sich beginnende Hämolyseneigung andeuten.)

Komplementbestimmungen:

β_1C/A Globulin (C3 quant.): 10 mg/dl (Normgr. 100-200mg/dl)

β_1-E-Globulin (C4 quant.): 48 mg/dl (Normgr. 20-50 mg/dl)

CH50-Hämolyse: überhaupt keine Hämolyse nachweisbar

CH100-Hämolyse: kleiner als 10 E/ml

Histologischer Befund nach Nierenbiopsie:

Mesangioendotheliale Glomerulonephritis

(Immunhistologische Untersuchungen im Nierengewebe und eine Konzentrationsbestimmung zirkulierender Immunkomplexe lagen hier nicht vor.)

Beurteilung:

Nach Klinik, Histologie und immunologischen Kriterien besteht kein Zweifel an einer akuten, postinfektiösen Immunkomplex-Nephritisentwicklung nach Einfluß betahämolytischer A-Streptokokken.

Alle Kriterien des Komplementverbrauches durch Komplementaktivierung sind in repräsentativen Meßwerten erfüllt.

Epikritische Bewertung der klinischen Einzelbeispiele:

Die Beispiele verschweigen mögliche Diskrepanzen bei Verwendung verschiedener Methoden zur Bestimmung der hämolytischen Komplementaktivierung nicht. Immerhin ist bei 5 von 6 Einzelanalysen der hohe Wert dieser Meßergebnisse für die Diagnose der entzündlichen Schubsituation übereinstimmend außer Frage gestellt. Immunpathogene Folgereaktionen gehen bei allen Immunkomplexerkrankungen auf die Aktivierung des Komplementsystems zurück. Entscheidend für den Nachweis dieser Komplementaktivierung ist nicht die immunhistologische Untersuchung nach Biopsie, ausschlaggebend sind vielmehr die Meßergebnisse im Serum der Patienten, wie sie in den vorgelegten klinischen Beispielen angewandt und anschaulich interpretiert sind.

6. Zusammenfassung

Die Bestimmung der hämolytischen Komplementgesamtaktivität wird als verläßliche Übersichtsmethode zur Beurteilung des Komplementgehalts von Serum und anderen Körperflüssigkeiten angewendet. Allgemein anerkannt ist bislang nur die verhältnismäßig aufwendige Methodik nach Mayer, der die Auflösung spezifisch sensibilisierter Hammelerythrozyten durch den Komplementgehalt des getesteten Serums und die photometrische Messung des hierbei freigesetzten Hämoglobins zugrunde liegt. Die Komplementmenge wird hierbei in CH50-Einheiten angegeben.

Die CH100-Methode hingegen ist eine Endpunktbestimmung, deren Meßprinzip die ringförmige Lyse sensibilisierter Hammelerythrozyten im Agar durch Diffusion von Serum darstellt. Bei dieser Methode wird der untersuchte Komplementgehalt in CH100-Einheiten angegeben. Dieses Verfahren ist wesentlich einfacher in der Durchführung und infolge der sich daraus ergebenden Zeit- und Kostenersparnis für das Routinelabor geeignet. Allerdings ist es bis heute noch nicht als adäquate Methode zur funktionellen Messung des Komplementgesamtgehalts anerkannt.

Zum Vergleich der beiden Methoden wurde die hämolytische Komplementgesamtaktivität von 122 Seren mit Hilfe der CH50-Bestimmung nach Mayer bei standardisierten Versuchsbedingungen und mit Hilfe der CH100-Methodik unter Verwendung standardisierter Immundiffusionsplatten parallel gemessen. Die Ergebnisse der Messungen wurden statistisch ausgewertet und unter Berücksichtigung der Verwendbarkeit der Methoden für die klinische Routine kritisch diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich überraschenderweise eine deutliche Übereinstimmung der Resultate beider Verfahren vor allem im klinisch relevanten Bereich stark erniedrigter Komplementtiter, wenn auch der Nachweis einer exakten linearen Korrelation der Titerhöhen beider Verfahren nicht geführt werden konnte. Da sich jedoch ein erheblicher Komplementverbrauch im Rahmen immunpathogener Folgereaktionen mit beiden Methoden zuverlässig feststellen läßt, erweist sich die CH100-Methode als ein für die Laborroutine praktikables Verfahren zur Bestimmung der hämolytischen Gesamtaktivität.

Demgegenüber sei abschließend aber doch noch einmal hervorgehoben, daß beim Vergleich der Ergebnisse beider Methoden die Endwerte nach oben

hin zunehmend divergieren. Daraus folgt, daß die CH100-Hämolyse-Technik den wissenschaftlichen Präzisionsgrad des CH50-Verfahrens keineswegs erreicht. Wenn in der vorliegenden Arbeit auch die CH100-Methodik in der Routinediagnostik als ein verantwortbares Verfahren dargestellt wird, so sei auf der anderen Seite abschließend und in kritischer Wertung noch einmal festgehalten, daß die CH100-Hämolyse-Technik für exakte wissenschaftliche Forschungsergebnisse nicht ausreicht. Dafür sind auch aus der Sicht der hier statistisch ermittelten Vergleichsergebnisse Verfahren erforderlich, die eine einwandfreie Sicherheit ihrer Ergebnisse in allen Bereichen garantieren. Für wissenschaftliche Untersuchungen braucht man auch heute noch die CH50-Hämolyse-Technik oder, besser noch, die Komplement-Komponenten-Titration.

Literaturverzeichnis

1. Alcalay, M. and Touchard, G.

Les deficits congenitaux en composants du complement.
Rev.Med.(Paris) 23/14, S.679-684 (1982)

2. Alper, C.A. and Rosen, F.S.

Clinical applications of complement assays.
Adv.Intern.Med. 20, S.61-88 (1975)

3. Bitter-Suermann, D.

Das Komplementsystem: Physiologische Funktion und klinische Bedeutung.
Deutsches Ärzteblatt 51/52, S.35-50 (1983)

4. Brade, V.

Komplement: Funktion, biologische Bedeutung und klinische Aspekte.
Münch.med.Wschr. 121/46, S.1521-1526 (1979)

5. Campbell, D.H. et al.

Methods in Immunology, 2nd ed., W.A. Benjamin, Inc.,
Nex York, S.300-324 (1970)

6. Chan, V.F. et al.

Prognostic significance of whole serum complement activity in dengue haemorrhagic fever.
Asian J.Infect.Dis. 2/2, S.176-178 (1978)

7. Clinical Aspects of the Complement System,
International Symposium, Bochum, October 1976,
ed. by Opferkuch, W., Rother, K. and Schultz, D.R.
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1978)

8. Cochrane, C.G. and Koffler, D.

Immune complex disease in experimental animals and man.
Adv.Immunol. 16, S.185-264 (1973)

9. Cochrane, C.G.

Initiating events in immune complex injury.
Progress in Immunology, ed. B. Amos, Academic Press,
New York and London, S.143-153 (1971)

10. Cochrane, C.G. and Dixon, F.J.

Antigen-Antibody complex induced disease.
Textbook of Immunopathologie, eds. Miescher, P.A. and
Müller-Eberhard, H.J., Grune & Stratton, New York -
San Francisco - London, S.137-156 (1976)

11. Fischer, E.

Hereditäre Komplementdefekte.
Hautarzt 33/2, S.65-72 (1982)

12. Gewurz, H. and Suyehira, L.A.

Complement.
Manual of Clinical Immunology, eds. Rose, N.R. and Friedman, H., 2.ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., S.163-174 (1980)

13. Gigli, I.

Perturbations of complement in disease.
Biological Amplification Systems in Immunology, Comprehensive Immunology, Vol.2, eds. Good and Day, Plenum Medical Book Company, New York and London, S.295-313 (1977)

14. Goldstein, J.M. and Weissmann, G.

Cellular and humoral mechanisms in immune complex injury.
Progress in Immunology II, Vol.5, eds.Brent, L. and Holborow, J., North-Holland Publishing Company, S.81-89 (1974)

15. Grandjean, E.M. et al.

Activation du complement dans diverses affections hepatiques.
Schweiz.med.Wschr. 109/46, S.1830-1832 (1979)

16. Hadding, U.

Komplement, biochemische Grundlagen und klinische Aspekte.
"Biotest-Mitteilungen", Sonderheft 5 (1977)

17. Jäger, L.

Klinische Immunologie und Allergologie, Teil I,
G. Fischer Verlag Stuttgart, S.129-152 u. 180-201 (1983)

18. Kabat, E.A. and Mayer, M.M.

Complement and Complement Fixation.
Experimental Immunochemistry, C.C. Thomas Publisher, Springfield/Ill., 2nd ed., S.133-153 (1964)

19. Koffler, D.

Immunpathogenesis of systemic lupus erythematosus.
Annu.Rev.Med. 25, S.149-164 (1974)

20. Krech, U.

Infektinduzierte Autoimmunphänomene.
Praxis der Immunologie, ed. Vorlaender, K.O., Georg Thieme Verlag Stuttgart, S.92-102 (1976)

21. Lachmann, P.J. and Hobart, M.J.

Complement technology.
Handbook of experimental immunology, 3rd ed., ed. Weir, D.M., Blackwell Scientific publications, S.5A1-5A23 (1978)

22. Lanzer, G.

Das Komplementsystem.
Lab.med. 5, S.157-166 (1981)

23. Laurell, A.-B.

Komplementfaktoren in der Labormedizin.
Laboratoriumsblätter 27, S.89-102 (1977)

24. Mallik, N.P. et al.

Complement and glomerular disease: A natural history study.
Nephron 27/2, S.67-73 (1981)

25. McCall, C.E.

Complement.
South.Med.J. 72/1, S.47-52 (1979)

26. McLean, R.H. and Michael, A.F.

Activation of the complement system in renal conditions in animals and man.
Progress in Immunology II, Vol.5, eds. Brent, L. and Holborow, J., North-Holland Publishing Company, S.69-79 (1974)

27. McLean, R.H. and Michael, A.F.

Properdin and C3-Proactivator: Alternate pathway components in human glomerulonephritis.
J.Clin.Invest. Vol.52, S.634-644 (1973)

28. Miniter, M.F., Stollar, B.D. and Agnello, V.

Reassessment of the clinical significance of native DNA-antibodies in systemic lupus erythematosus.
Arthritis rheum. 22/9, S.959-968 (1979)

29. Müller-Eberhard, H.J.

Complement.
Annu.Rev.Biochem. 44, S.697-723 (1975)

30. Müller-Eberhard, H.J.

The Serum Complement System.
Textbook of Immunopathology, eds. Miescher, P.A. and Müller-Eberhard, H.J., Grune & Stratton, S.45-73 (1976)

31. Olenchock, S.A. et al.

Activation of the alternative pathway of complement by grain.
Clin.Allergy Vol.8, S.125-133 (1978)

32. Opferkuch, W. und Cullmann, W.

Komplementsystem.
Immunologie: Grundlagen - Klinik - Praxis, ed. Vorlaender, K.O., Georg Thieme Verlag Stuttgart, S.72-92 (1983)

33. Opferkuch, W. et al.

Klinische Ausprägung und Therapie des hereditären angioneurotischen Ödems (HANE).
Immun.Infekt. 8, S.56-60 (1980)

34. Porter, R.R. and Reid, K.B.M.

The biochemistry of complement.
Nature Vol.275, S.699-704 (1978)

35. Rapp, H.J. and Borsos, T.

Molecular Basis of Complement Action, Appleton-Century-Crofts, New York, S.75-84 (1970)

36. Rashid, H., Bird, P.A.E., Vernazza, T. et al.

Raised serum haemolytic complement activity in glomerulonephritis: A bad prognostic sign.
Br.Med.J. 282/6271, S.1196-1197 (1981)

37. Ringelmann, R., Opferkuch, W., Röllinghoff, M. und Loos, M.

Komplementmessungen mit Hilfe des Mikrolitersystems.
Z.med.Mikrobiol.u.Immunol. 154, S.329-343 (1969)

38. Ritz, E.

Immunmechanismen bei der Glomerulonephritis.
Therapiewoche 30/44, S.7320-7334 (1980)

39. Rose, N. et al.

Complement determinations.
Methods in Immunodiagnosis, eds. Rose, N.R. and Bigazzi, P.E., John Wiley & Sons, S.31-43 (1973)

40. Rother, K., Hadding, U. und Till, G.

Komplement. Biochemie und Pathologie.
Steinkopff Verlag, Darmstadt (1974)

41. Ruddy, S., Gigli, I. and Austen, K.F.

The complement system of man.
N.Engl.J.Med. 287, S.489-495,545-549,592-596,642-646 (1972)

42. Salkie, M.L. and Kelker, D.H.

An investigation into the relationships between serum levels of C3, C4 and CH50.
Vox sang. 41/5-6, S.282-286 (1981)

43. Schindera, F. und Wilms, H.

Das hereditäre angioneurotische Ödem.
Die gelben Hefte der Behringwerke 4/78, S.141-145 (1978)

44. Schorlemmer, H.-U.

Das Komplement-System.
Die gelben Hefte Jahrg. XXII, S.49-59 (1982)

45. Schultz, D.R.

The Complement System.
Monographs in Allergy, Vol.6 (1971)

46. Schur, P.H. and Sandson, J.

Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus.
N.Engl.J.Med. 278, S.533-538 (1968)

47. Seyfarth, M.

Komplementtitration.
Immunologische Arbeitsmethoden, ed. Friemel, H.,
G. Fischer Verlag Stuttgart, S.121-124 (1980)

48. Siegenthaler, W.

Klinische Pathophysiologie, 4.Aufl.,
Georg Thieme Verlag Stuttgart, S.514 (1979)

49. Sobel, A.

Le complement serique.
Rev.Med.(Paris) 23/12, S.551-557 (1982)

50. Stanziale, P., Pertosa, G., Pecoraro, C. et al.

Biological significance of the nephritic factor in membranoproliferative glomerulonephritis.
Minerva Nefrol. 28/2, S.127-131 (1981)

51. Steffen, C.

Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, S.611-615 (1968)

52. Suyehira, L.A. and Gewurz, H.

Clinical Assay of the Complement-System.
Laboratory Medicine, Vol.8, No.8, S.29-34 (1977)

53. Tilz, G.P.

Antikörpervermittelte Folgereaktionen.
Praxis der Immunologie, ed. Vorlaender, K.O.,
Georg Thieme Verlag Stuttgart, S.34-58 (1976)

54. Wahn, V. et al.

Das Komplement-System in der Diagnostik von Erkrankungen im Kindesalter.
Der Kinderarzt 12, S.1826-1828 (1979)

55. WHO Bull. 39,935 (1968)

56. WHO report. Nomenclature of the alternative pathway of complement.
Eur.J.Immunol. 11/8, S.668-669 (1981)

57. Williams, C.A. and Chase, M.W.
Complement.
Methods in Immunology and Immunochemistry Vol.IV, S.127-151 (1978)

58. Winston, D.J. et al.

Pneumococcal infections after human bone-marrow transplantation.
Ann.Intern.Med. 91/6, S.835-841 (1979)

59. Zwilling, R.

Quantitative Mikro-Complement-Fixierung.
Immunologisches Praktikum, Fischer Verlag, S.49-58 (1974)

Herrn Professor Vorlaender danke ich an dieser Stelle herzlich für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung dieser Dissertation, insbesondere für seine Anregungen und Vorschläge während der Arbeit und manches ermunternde Wort.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr.Schmolke (Immunologische Laboratorien), der mich bei der Überwindung mancher versuchstechnischer Schwierigkeiten unterstützte. Außerdem danke ich Herrn Professor Fuchs (Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation) für die Beratung bei der statistischen Auswertung.

LEBENSLAUF

1959 2.März geboren in Berlin als Sohn des Assessors Günter Wagner und seiner Ehefrau Annemarie

1965 April Einschulung in die Hansa-Grundschule in Berlin-Tiergarten

1969 April Übergang auf das Goethe-Gymnasium in Berlin-Wilmersdorf

1977 Mai Abitur

Oktober Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin

1979 August Ärztliche Vorprüfung (Physikum)

1980 August 1.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1982 Juni Beginn der Dissertation bei Prof. Vorlaender

1984 März 2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

April Beginn der Ausbildung im Praktischen Jahr

1985 April Schriftlicher Teil des 3.Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Juni Mündlicher Teil des 3.Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Juni Approbation als Arzt

Juli Abschluß der Dissertation